

Université de Montréal

**Effet de chaperones pharmacologiques sur les
formes mutantes du récepteur mélanocortine de
type 4 responsables de l'obésité morbide précoce**

par

Douce Michaud

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences
en Biochimie

Août, 2009

© Douce Michaud, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Effet de chaperones pharmacologiques sur les formes mutantes du récepteur
mélanocortine de type 4 responsables de l'obésité morbide précoce

présenté par :
Douce Michaud

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Luc DesGroseillers, président-rapporteur
Michel Bouvier, directeur de recherche
Terrence Hébert, membre du jury

Résumé

Le récepteur mélanocortine de type 4 (MC4R) est un récepteur couplé aux protéines G impliqué dans la régulation de la prise alimentaire et de l'homéostasie énergétique. Quatre-vingt pour cent des mutants du MC4R reliés à l'obésité morbide précoce (OMP) sont retenus à l'intérieur de la cellule. Le système de contrôle de qualité (SCQ) est probablement responsable de cette rétention, par la reconnaissance d'une conformation inadéquate des mutants. Le rétablissement de l'expression à la surface cellulaire et de la fonctionnalité de ces mutants est donc d'intérêt thérapeutique. Dans cette optique, des composés lipophiles spécifiques pour le MC4R ont été sélectionnés sur la base de leur sélectivité. Nous avons démontré qu'ils agissent à titre de chaperone pharmacologique (CP) en rétablissant l'expression à la surface cellulaire et la fonctionnalité des récepteurs mutants S58C et R165W, et qu'ils favorisent leur N-glycosylation complexe (maturation). Le suivi par BRET du site d'action des CP du MC4R suggère une action en aval de l'interaction calnexine-MC4R. De manière générale, une CP peut avoir un effet différent selon le mutant traité en induisant des conformations distinctes du récepteur plus ou moins aptes à se dissocier du SCQ et à activer la voie de signalisation, et un mutant peut répondre différemment selon la CP utilisée par des différences d'affinité pour le ligand, la CP et les effecteurs. Une meilleure compréhension du mode d'action des CP pourrait aider au développement de nouvelles approches thérapeutiques non seulement pour l'OMP, mais aussi pour d'autres maladies conformationnelles causées par le mauvais repliement de protéines.

Mots-clés :

Récepteur mélanocortine de type 4, MC4R; récepteur couplé aux protéines G, RCPG; maladie conformationnelle; obésité morbide précoce, OMP; système de contrôle de qualité; chaperone pharmacologique, CP; immunoprécipitation de surface, IP de surface; transfert d'énergie de résonance provenant d'une source bioluminescente, BRET.

Abstract

The MC4R is a G-protein coupled receptor involved in the central regulation of food intake and energy homeostasis. Eighty percent of childhood obesity-related MC4R mutants are retained intracellularly, probably via the quality control system acting on misfolded receptors. Thus, rescuing cell surface targeting and functionality of these mutant receptors could be of therapeutic value. Cell permeable MC4R selective ligands have been tested and were able to restore cell surface expression and signalling activity of S58C and R165W MC4R mutants. Those compounds, according to their mode of action, are described as pharmacological chaperones (PC). The MC4R-PCs also helps to rescue the glycosylation pattern (maturation) of the MC4R mutants. The site of action of MC4R-PCs of the MC4R mutants monitored by BRET suggests an action downstream of the calnexin-MC4R interaction, most likely at the level of the Golgi apparatus. Generally, a CP can have different effects according to the mutant by stabilizing distinct conformations of the receptor that are more or less able to exit the quality control system and to activate the signaling pathway, and a mutant can respond differently according to the CP used by its distinct affinity to the ligand, the CP itself and the effectors. A better understanding of PCs' mode of action could help in the design of novel therapeutic approaches not only for early-onset morbid obesity (EOMO) but also for other conformational diseases resulting from protein misfolding.

Keywords :

Melanocortin 4 receptor, MC4R; G protein coupled receptor, GPCR; conformational disease; early-onset morbid obesity, EOMO; quality control system; pharmacological chaperone, PC; surface immunoprecipitation, surface IP; Bioluminescence Resonance Energy Transfer, BRET.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures	xii
Abréviations	xiv
Remerciements	xix
1. INTRODUCTION	1
1.1 Le récepteur mélanocortine de type 4	1
1.1.1 Généralités	1
1.1.2 Structure.....	1
1.1.2.1 Motifs conservés.....	2
1.1.2.1.1 Motifs de liaison à la protéine G.....	2
1.1.2.1.2 Les modifications co-/post-traductionnelles.....	4
1.1.2.1.2.1 La phosphorylation	4
1.1.2.1.2.2 La palmitoylation.....	4
1.1.2.1.2.3 La formation de ponts disulfures.....	4
1.1.2.1.2.4 La N-glycosylation	4

1.1.3 La famille des récepteurs mélanocortine.....	7
1.1.3.1 Rôles physiologiques et expression.....	7
1.1.3.2 Les ligands mélanocortines.....	7
1.1.4 Le rôle du MC4R dans le système nerveux central.....	10
1.1.4.1 Expression	10
1.1.4.2 Mécanisme d'activation.....	12
1.1.4.3 Confirmation du rôle.....	14
1.1.4.3.1 Mutations ponctuelles du MC4R chez l'humain	15
1.2 L'acheminement des RCPG à la membrane plasmique.....	18
1.2.1 L'entrée dans la voie de sécrétion.....	19
1.2.1.1 Le cycle de la calnexine	19
1.2.1.1.1 Réussite du repliement	21
1.2.1.1.2 Échec du repliement	22
1.3 Les maladies conformationnelles	23
1.4 Stratégie pharmacologique de réchappement des récepteurs mutés	24
1.4.1 Historique.....	24
1.4.1.1 Le diabète insipide néphrogénique.....	26
1.5 Mise en situation pour la présente étude	27
1.5.1 Des chaperones pharmacologiques pour le MC4R?	28
1.5.2 Le mécanisme et le site d'action des composés AT3163 , AT3186 et AT3228	28
1.5.2.1 Caractérisation de la maturation du MC4R en absence et en présence des composés AT3163 , AT3186 et AT3228	28
1.5.2.2 Site d'action des chaperones pharmacologiques.....	29
1.5.3 Choix des mutants	29

1.6 Hypothèse et objectifs	31
1.6.1 Hypothèses	31
1.6.2 Objectifs	31
 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	 32
2.1 Matériel.....	32
2.2 Méthodes	33
2.2.1 Constructions d'ADN	33
2.2.2 Culture cellulaire	36
2.2.3 Essais	37
2.2.4 Statistiques	44
 3. RÉSULTATS	 45
3.1 Identification de chaperones pharmacologiques.....	47
3.1.1 Le composé AT3163	49
3.1.2 Le composé AT3228	49
3.1.3 Le composé AT3186	50
3.2 Mécanisme d'action des chaperones pharmacologiques	52
3.2.1 Patron de migration du récepteur (variation du ratio mature/immature)	54
3.2.2 Enrichissement des récepteurs présents à la surface cellulaire	57
3.2.2.1 IP de surface du V2R	57
3.2.2.2 IP de surface du MC4R	61

3.2.3 Essai de proximité du récepteur avec la calnexine dans le RE suivi par BRET	66
3.2.3.1 Transfert d'énergie de bioluminescence par résonance (BRET).....	67
3.2.3.1.1 Principe	67
3.2.3.1.2 Courbes de saturation.....	69
3.2.3.2 Essai de proximité du récepteur avec la calnexine dans le RE suivi par BRET	71
4. DISCUSSION	81
4.1 Identification de chaperones pharmacologiques pour le MC4R	83
4.1.1 Le MC4R(WT)	83
4.1.1.1 Effet des CP sur l'expression à la surface cellulaire du MC4R(WT)	83
4.1.1.1.1 Les CP antagonistes	83
4.1.1.1.2 Les CP agonistes.....	85
4.1.1.2 Effet des CP sur la production d'AMPc du MC4R(WT)	86
4.1.1.2.1 Les CP antagonistes	86
4.1.1.2.2 La CP agoniste	87
4.1.2 Le MC4R(S58C).....	89
4.1.3 Le MC4R(R165W).....	91
4.1.4 Le MC4R(P299H).....	93
4.1.5 La comparaison des CP	94
4.2 Effet des CP sur la maturation du MC4R	95
4.2.1 Profil de maturation du MC4R par immunobuvardage de type Western	96
4.2.1.1 IP sur lysat total	96
4.2.1.2 IP de surface	98
4.2.1.2.1 Confirmation des formes immature et mature	98

4.2.1.2.2	Présence de récepteur immature sur les immunobuvardages des IP de surface.	99
4.2.1.2.3	Correspondance entre l'effet des CP sur la maturation et l'expression à la surface cellulaire.	99
4.2.1.2.4	Conclusion de l'essai	101
4.3	Effet des CP sur la proximité du récepteur avec la CNX dans le RE	102
4.3.1	Essai de proximité du récepteur avec la calnexine dans le RE suivi par BRET	102
4.3.1.1	Le MC4R(WT) a une plus grande rétention dans le RE que le V2R(WT)	104
4.3.1.2	Les mutants du MC4R ont une plus faible rétention dans le RE que le V2R(W164S)	104
4.3.1.3	Effet des CP sur la proximité du récepteur avec la CNX dans le RE	104
4.3.1.3.1	L'agoniste AT3186 semble être plus efficace pour diminuer la proximité du MC4R avec la CNX	105
4.3.1.3.2	L' AT3228 diminue le nombre de récepteur mutants à proximité de la CNX	105
4.3.1.3.3	L' AT3163 ne réussit à diminuer le nombre de récepteur à proximité de la CNX que pour le mutant S58C	106
4.3.1.3.4	Hypothèses de l'effet modeste des CP du MC4R dans l'essai de BRET	106
4.3.1.4	Certaines CP augmentent l'expression totale du MC4R	108
4.3.1.4.1	Effet de l'augmentation de l'expression totale du MC4R sur le signal de BRET	109
4.3.1.5	Résumé de l'essai BRET	112
4.4	Perspective thérapeutique des CP	113
5.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	116

6. BIBLIOGRAPHIE	118
7. ANNEXES	126
7.1 Spécificité des CP au MC4R.....	126
7.2 Rétablissement de l'expression à la surface cellulaire du V2R par le composé SR121463	127
7.3 Marquages métaboliques au ³⁵S du MC4R et du V2R suivi de chasses	128
7.3.1 Principe et explication des résultats	129
7.4 Niveau d'expression des récepteurs-Luc dans les essais BRET de sortie du RE	131

Liste des tableaux

Tableau I. Vue globale des ligands endogènes, du site d'expression et de la fonction des différents MCR.....	9
Tableau II. Sites principaux d'expression du MC4R dans le cerveau du rat.	13
Tableau III. Récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) impliqués dans des maladies conformationnelles.	24
Tableau IV. La structure des composés lipophiles spécifiques au MC4R et leur affinité au MC4R(WT).....	46

Liste des figures

Figure 1.1. Topologie des récepteurs couplés aux protéines G.....	2
Figure 1.2. Le récepteur mélanocortine de type 4.....	3
Figure 1.3. Évolution des N-polyosides de protéines passant par la voie de sécrétion.....	6
Figure 1.4. Notions d'agonisme, antagonisme et agonisme inverse.....	8
Figure 1.5. La pro-opiomélanocortine et ses dérivés de clivage post-traductionnel.....	8
Figure 1.6. Expression des gènes POMC et AgRP dans le cerveau et innervation des neurones les exprimant.....	12
Figure 1.7. Mécanisme d'activation/inhibition du MC4R dans le cerveau	13
Figure 1.8. Confirmation de l'implication des éléments de la voie de signalisation du MC4R dans l'homéostasie énergétique.....	14
Figure 1.9. Le MC4R du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus est impliqué dans le contrôle de la prise alimentaire seulement	16
Figure 1.10. La rétention intracellulaire du MC4R causée par une mutation ponctuelle mène à l'augmentation de la prise alimentaire et à la diminution de la dépense énergétique.....	17
Figure 1.11. Les différents points de contrôle de système de contrôle de qualité.....	18
Figure 1.12. Le cycle de la calnexine.....	20
Figure 1.13. Un aperçu de quelques mutations ponctuelles du MC4R humain	30
Figure 2.1. Principe de l'essai HTRF cAMP dynamic 2 kit de Cis-Bio.	38
Figure 3.1. Confirmation de l'action de chaperone pharmacologique des composés spécifiques au MC4R sélectionnés	48
Figure 3.3. Principe de l'immunoprécipitation de surface	58
Figure 3.4. Identification des formes matures et immatures du V2R	59
Figure 3.5. Identification des formes matures et immatures du MC4R	63
Figure 3.6. Principe du transfert d'énergie de bioluminescence par résonance (BRET)...	68
Figure 3.7. Principe des courbes de saturation du récepteur-Luc par la calnexine-Venus en BRET dans le cas d'un récepteur mutant retenu dans le RE (hypothèse)	70
Figure 3.8. Essai de sortie de récepteurs du réticulum endoplasmique, suivant un traitement avec des chaperones pharmacologiques.....	77
Figure 4.1. Courbe de saturation de la CNX-Venus par une quantité croissante de Récepteur-Luc (hypothèse).....	111

Figure 7.1. Effet des chaperones pharmacologiques spécifiques au MC4R sur le réchappement de l'expression à la surface cellulaire du V2R.....	126
Figure 7.2. Expression relative à la surface cellulaire du V2R mesurée par cytométrie de flux.....	127
Figure 7.3. Marquage métabolique du 3HA-MC4R(WT) et du 3HA-V2R(WT) suivi d'une chasse	128
Figure 7.4. Niveau d'expression des récepteurs-Luc dans les essais BRET de sortie du RE.....	131

Abréviations

ACTH	Hormone adrénocorticotrope (<i>Adrenocorticotropic hormone</i>)
AgRP	Protéine reliée à l'agouti (<i>Agouti-related protein</i>)
ALP	Protéine apparentée à l'attractine (<i>attractin-like protein</i>)
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
Asn	Asparagine
AT1R	Récepteur de l'angiotensine 1
BRET	Transfert d'énergie par résonance provenant d'une source bioluminescente (<i>Bioluminescence Resonance Energy Transfer</i>)
BSA	Albumine de sérum bovin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CaSR	Récepteur sensible au calcium (<i>calcium-sensing receptor</i>)
Ci	Curie
CFTR	Régulateur de la conductance transmembranaire impliqué dans la fibrose kystique (<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>)
CNX	Calnexine
CP	Chaperone pharmacologique
CRLR	Récepteur similaire au récepteur de la calcitonine
DIN	Diabète insipide néphrogénique
DMEM	Milieu Eagle modifié de Dulbecco (<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)

ELISA	Dosage immunoenzymatique sur support solide (<i>Enzyme-linked immunosorbant assay</i>)
EndoH	Endoglycosidase H
ERGIC	Compartiment intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (<i>ER-Golgi intermediate compartment</i>)
eYFP	Protéine fluorescente jaune optimisée (<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>)
FBS	Sérum foetal bovin (<i>fetal bovine serum</i>)
<i>g</i>	Force de centrifugation <i>g</i>
GlcNAc	N-Acétylglucosamine
Glc	Glucose
HEK 293	Cellules embryonnaires de rein humain 293 (<i>human embryonic kidney 293 cells</i>)
HRP	Peroxydase de raifort (<i>horseradish peroxidase</i>)
HTRF	Fluorescence homogène en temps résolu (<i>homogeneous time resolved fluorescence</i>)
IB	Immunobuvardage de type Western
IBMX	Isobutylméthylxanthine
IC ₅₀	Concentration de ligand froid déplaçant 50% de la liaison spécifique du radioligand
IP	Immunoprécipitation
IP de surface	Immunoprécipitation de protéines à la surface cellulaire
Luc	<i>Renilla</i> Luciférase
LHR	Récepteur de l'hormone lutéinisante (<i>luteinizing hormone receptor</i>)
Man	Mannose
MC4R	Récepteur mélanocortine de type 4 (<i>melanocortin-4 receptor</i>)
min	Minute
mL	Millilitre

MSH	Hormone stimulant les mélanocytes (<i>melanocyte stimulating hormone</i>)
nm	Nanomètre
OMP	Obésité morbide précoce
PBS	Solution saline tamponnée au phosphate (<i>phosphate buffered saline</i>)
DPBS	Solution saline tamponnée au phosphate de Dulbecco (<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>)
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne (<i>polymerase chain reaction</i>)
PKA	Protéine kinase A
POMC	Pro-opiomélanocortine
pH	Potentiel hydrogène
PI	Iodure de propidium (<i>propidium iodide</i>)
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulphonyle (<i>Phenylmethylsulphonyl Fluoride</i>)
PNGase F	Peptide N-Glycosidase F
PVDF	Polyfluorure de vinylidène (<i>polyvinylidene fluoride</i>)
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
RFU	Unité relative de fluorescence (<i>relative fluorescence unit</i>)
RLU	Unité relative de luminescence (<i>relative luminescence unit</i>)
rpm	Révolution par minute
SDS	Sodium dodécylsulfate
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
Ser	Sérine
SEM	Erreur standard de la moyenne (<i>standard error of the mean</i>)

STI	Inhibiteur de la trypsine de la fève de soja (<i>Soybean trypsin inhibitor</i>)
TBS	Solution saline tamponnée au Tris
TBS-0,2%T	Solution saline tamponnée au Tris contenant 0,2% de Tween-20
Thr	Thréonine
TR-FRET	Transfert d'énergie combiné à la fluorescence homogène en temps résolu
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
Tris-HCl	Tris ayant un pH ajusté avec du HCl
TSHR	Récepteur de la thyrotropine
U/mL	Unité par millilitre
V2R	Récepteur V2 de la vasopressine
WT	De type sauvage (<i>Wild type</i>)

À mon grand frère Matthieu (1975-2004)

Remerciements

Merci... à mon directeur de recherche Michel Bouvier pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Son enthousiasme est contagieux, et son rire aussi d'ailleurs! J'espère avoir pu tirer profit du don de communicateur que possède Michel. Ma pensée chaotique est dure à dompter, mais je crois que Michel m'a aidé à l'améliorer! Merci pour les congrès auxquels j'ai pu participer et merci aussi de m'avoir permis de prendre des tâches d'auxiliaire d'enseignement, cette expérience m'est très précieuse.

Merci... à Patricia René pour l'ensemble de son œuvre! Support scientifique, technique et psychologique, Patricia est dotée d'une patience incroyable! Merci de m'avoir guidée et dirigée dans mon périple! Merci pour ta contribution technique et ta grande (sinon énorme!) aide dans l'écriture de ce mémoire! Que dire de plus! Je te suis infiniment reconnaissant!

Merci... à Driss pour m'avoir initié au monde de la paillasse lors de mon stage, et pour avoir été tellement plus qu'un superviseur de stage, soit un bon ami. Un exemple humain à suivre, sauf pour la prohibition du bacon! ☺

Merci... à tous les membres du laboratoire, passés et présents, pour leur aide et leur agréable compagnie : Geneviève, Madeleine, Ségolène, Bibi, Kiki, Titi, Marty, Riri, Sly, Waynee, WiFi, J-P, Hiro, Elena, Emma, Koji, Mireille, André, Hélène, Thomas et Julie, avec une mention spéciale pour Morad et Éric pour leur support dans le projet V2R (et pour leur bon esprit!) et à Marc et Patricia pour l'aide technique en cytométrie de flux. Merci à Virginie Bernier qui a généré plusieurs résultats importants avant mon arrivée au laboratoire. Ses résultats ont été une source d'inspiration pour mon projet.

Merci... à mes 7 grands amis du baccalauréat (en particulier René, Alex, Évelyne et Julie pour leur grande complicité), à mon amie Isabel (une grande découverte lors du GPCR Retreat de Détroit!) et à mes amis de toujours, en particulier Véronick, Véronique et Jean-François. Vous avez participé à ce que je suis aujourd'hui! Une mention spéciale pour Julie et Isabel qui m'ont soutenue moralement pendant la rédaction! Merci Isa pour les μL ! ☺

Merci... à Sébastien Lemieux pour l'analyse statistique des courbes de saturation en BRET et à Christian Charbonneau pour son aide avec le programme Illustrator.

Merci... à mes grand-mères Cécile et Géraldine. Vous vous êtes battues dans la vie. Vous avez été des modèles pour moi. Merci pour votre support et votre confiance en moi!

Merci... à mes parents Jean-Claude et Danielle, ainsi qu'à mon frère Vincent. Vous avez toujours cru en moi et m'avez supporté dans toutes les épreuves de ma vie. Merci d'avoir entretenu ma curiosité! Après toutes ces années à jouer à Docte-Rat, je finirai avec une maîtrise! ☺

Merci... à mon neveu Guillaume, qui même à 12 ans comprend que sa tante ait dû consacrer beaucoup de temps à ses études! Tant de sagesse dans un si jeune homme!

Merci... à Martin pour sa présence dans ma vie, pour son support dans cette grande épreuve, pour son aide dans l'écriture et dans la mise en forme (aide indispensable!) et pour son appui moral. Tes encouragements et ton relativisme m'ont aidé à passer au travers de ce moment ardu! J'ai beaucoup apprécié les parties de *MasterMind* avant le coucher, ça m'a permis de décrocher avant de m'endormir! ☺

Merci... aux organismes subventionnaires GRUM, Astra-Zeneca, IRSC, FES – Fondation Luigi-Liberatore, qui ont soutenu financièrement mes recherches.

Et finalement...

Merci... à mon grand frère Matthieu, mon mentor, qui nous a quittés trop vite. Des études en biochimie perdent tout leur sens lorsqu'on fait face à une mort de cause inconnue. Matthieu était si travaillant, je ne pouvais faire autrement que de terminer ce que j'avais entrepris. Merci pour cet héritage.

1. INTRODUCTION

Le récepteur mélanocortine de type 4 (MC4R) joue un rôle important dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. L'inactivation de ce récepteur entraîne l'apparition d'une obésité morbide précoce (OMP), qui est souvent causée par une mutation ponctuelle dans la séquence primaire du récepteur. Dans la plupart des cas, la perte de fonction des formes mutantes du MC4R est engendrée par la rétention intracellulaire du récepteur mal replié par le système de contrôle de qualité de la cellule.

Dans le contexte de ce mémoire, nous traiterons de la capacité de composés spécifiques au MC4R à rétablir l'expression à la surface cellulaire de mutants retenus à l'intérieur de la cellule comme traitement potentiel pour l'OMP. Nous étudierons plus particulièrement l'effet de ces composés sur les formes mutantes du MC4R survenant naturellement chez l'homme. Dans l'introduction qui suit, les caractéristiques du MC4R, le procédé d'acheminement à la surface des RCPG, les maladies conformationnelles et la stratégie pharmacologique de rétablissement des récepteurs mutés à la surface cellulaire seront discutés.

1.1 Le récepteur mélanocortine de type 4

1.1.1 Généralités

Le récepteur mélanocortine de type 4 (MC4R) est une protéine de 332 acides aminés encodée par un gène à un seul exon situé sur le chromosome 18q22 [1, 2]. Ce récepteur fait partie de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), plus particulièrement de la sous-famille 1 apparentés à la rhodopsine (*Rhodopsin-like*), et signale via le couplage à la protéine G_s [2].

1.1.2 Structure

En tant que membre de la grande famille des RCPG, le MC4R partage leur structure commune, incluant les 7 domaines transmembranaires (TM) en hélice alpha reliés par 3 boucles intracellulaires (BI) et 3 boucles extracellulaires (BE) (Figure 1.1). Le domaine N-terminal (N-ter) est du côté extracellulaire et le domaine C-terminal (C-ter), du côté

cytosolique [3]. Ayant une courte séquence protéique par rapport aux autres RCPG, le MC4R est caractérisé par ses petites boucles intra- et extracellulaires ainsi que ses courts domaines N- et C-terminaux (soit 49 et 28 acides aminés, respectivement). Selon sa séquence primaire, le MC4R a une masse moléculaire prédite de 37 kDa.

1.1.2.1 Motifs conservés

Plusieurs motifs dans la séquence primaire d'acides aminés sont conservés dans cette grande famille et sont présents chez le MC4R. Ces divers motifs sont illustrés à la figure 1.2.

1.1.2.1.1 Motifs de liaison à la protéine G

Les motifs DRY (TM3) et N/DPXXY (TM7), qui sont conservés au sein de la superfamille des RCPG et sont impliqués dans l'activation du récepteur, entre autres par la liaison de la protéine G [4-8], sont retrouvés dans la séquence primaire du MC4R.

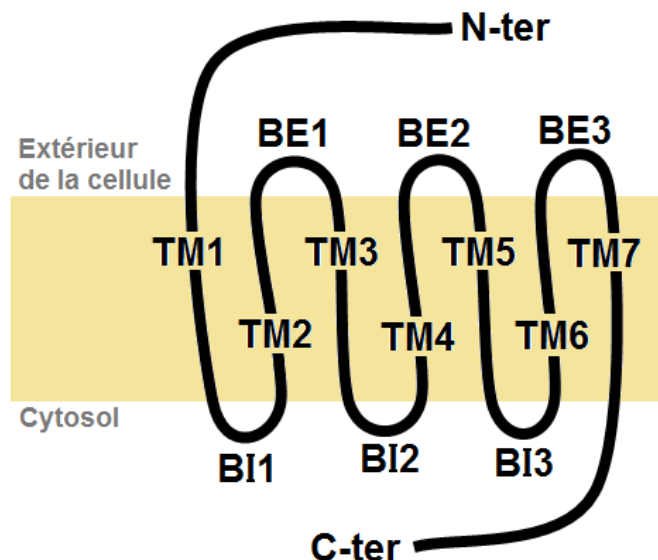


Figure 1.1. Topologie des récepteurs couplés aux protéines G. N-ter : extrémité N-terminale. C-ter : extrémité C-terminale. TM : domaine transmembranaire. BE : boucle extracellulaire. BI : boucle intracellulaire.

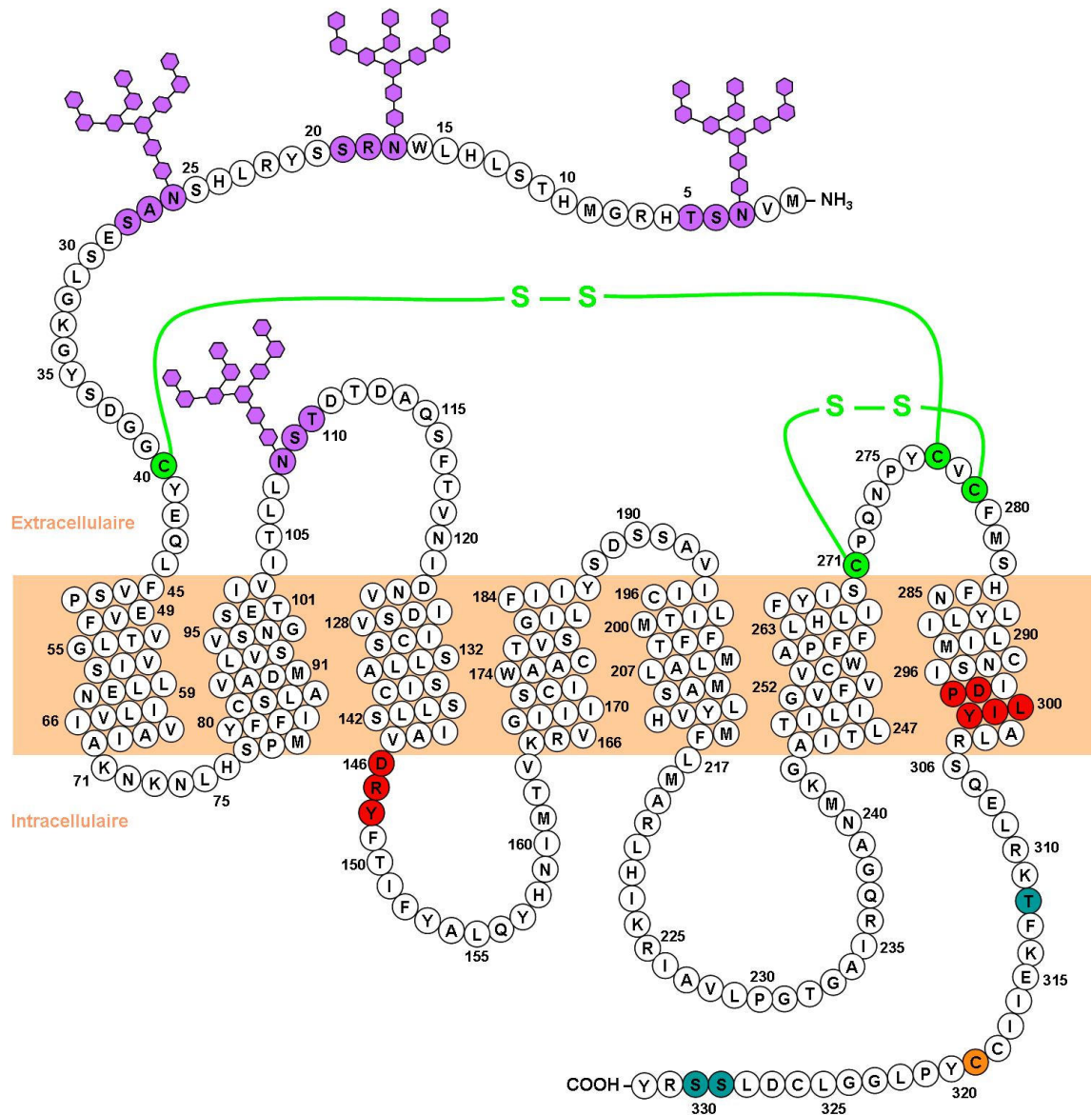


Figure 1.2. Le récepteur mélanocortine de type 4. Les séquences consensus DRY et DPXXY sont indiquées en rouge. Les sites de phosphorylation (bleu), les sites potentiels de N-glycosylation (mauve) et les cystéines impliquées dans la formation de ponts disulfures (vert) sont surlignés. La cystéine conservée chez les MCR en C-terminal suspectée comme étant un site de palmitoylation est surlignée en orangé. Note : les oligosaccharides ne sont pas à l'échelle [9].

1.1.2.1.2 Les modifications co-/post-traductionnelles

1.1.2.1.2.1 *La phosphorylation*

La signalisation des RCPG est régulée par différents mécanismes, entres autres par l'atténuation de la signalisation, ou désensibilisation. Ce processus est associé à la phosphorylation de résidus sérine ou thréonine dans la 3^e boucle intracellulaire (BI3) ou le C-terminal par des kinases de RCPG (GRK) ou des kinases dépendantes du second messenger. Le MC4R contient 3 sites de phosphorylation sur son domaine C-terminal (T312, S329 et S330). La phosphorylation de ces 3 sites par la GRK2 et/ou la protéine kinase A (PKA) suite à l'activation par un agoniste engendre l'internalisation du récepteur d'une manière dépendante de la β -arrestine et de la dynamine [10].

1.1.2.1.2.2 *La palmitoylation*

Cette modification post-traductionnelle n'a pas encore été démontrée pour le MC4R, mais une cystéine conservée en C-terminal [11] serait un site potentiel d'acylation (palmitoylation) [4, 12].

1.1.2.1.2.3 *La formation de ponts disulfures*

Le pont disulfure hautement conservé chez les RCPG de la famille 1, entre la 1^{ère} et la 2^e boucle extracellulaire (BE1 et BE2), est distinctement manquant chez le MC4R [11, 13, 14]. En effet, quatre cystéines sont présentes du côté extracellulaire, mais sont situées l'une dans le N-terminal et les 3 autres sur la 3^e boucle extracellulaire (BE3), ce qui rend impossible la formation du pont disulfure attendu. La structure du MC4R est toutefois stabilisée par 2 ponts disulfure, l'un connectant le N-terminal à la BE3 par les résidus C40 et C279 et l'autre étant présent à l'intérieur de la même boucle (BE3) entre le C271 et le C277 [13, 14].

1.1.2.1.2.4 *La N-glycosylation*

Le MC4R contient 4 sites potentiels de N-glycosylation (Asn3, Asn17, Asn26, Asn108) dans ses domaines extracellulaires. La N-glycosylation est exécutée sur presque toutes les protéines passant par la voie de sécrétion [15] et est amorcée dès l'entrée du polypeptide naissant dans le réticulum endoplasmique (RE) par l'ajout co-traductionnel et

co-translocationnel d'un oligosaccharide ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, où Glc : glucose, Man : mannose et GlcNAc : N-Acétylelucosamine) sur les résidus asparagine des séquences consensus N-X-S/T, où X peut être n'importe quel acide aminé sauf la proline [16-19]. Ce site est nécessaire, mais pas suffisant pour assurer la N-glycosylation, le contexte structural autour de cette séquence consensus étant important. Dans le cas du MC4R, l'absence de prolines autour de ces séquences consensus renforce la probabilité que ces sites soient glycosylés.

La maturation des N-glycans est amorcée dans le RE par le retrait de 3 résidus de glucose et d'un résidu mannose, pour ensuite se poursuivre et s'achever dans l'appareil de Golgi, par le retrait de 3 résidus de mannoses et l'ajout séquentiel de résidus de N-acétylelucosamine (GlcNAc) (citerne médian), de galactose (citerne *trans*) et d'acide sialique (NANA) (citerne *trans*). L'évolution de l'oligosaccharide dans la voie de sécrétion est expliquée à la figure 1.3. Un autre type de glycosylation a aussi lieu dans le Golgi, soit la O-glycosylation, qui se produit cette fois sur les résidus sérine et thréonine [20]. Les modifications co- et post-traductionnelles de la sorte font partie de l'entité structurale du récepteur fonctionnel et sont donc associées à la maturation de la protéine. La N-glycosylation étant un processus long et évoluant au court du trafic du récepteur vers la membrane, en général, plus le récepteur approche de la membrane plasmique, plus le N-polyoside est complexe, ainsi, plus la masse moléculaire apparente est augmentée. Les formes matures et immatures peuvent donc être distinguées suite à un fractionnement par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE).

Tel que mentionné dans la légende de la figure 1.3, il est possible de confirmer l'identité des formes matures et immatures par l'action d'enzymes glycosidases spécifiques. En effet, une fois que les protéines passent le saccule médian de l'appareil de Golgi, elles deviennent résistantes à la digestion par l'endoglycosidase H (EndoH), mais demeurent sensibles à l'enzyme peptide N-glycosidase F (PNGase F) [21]. La digestion avec ses enzymes préalablement au fractionnement par gel SDS-PAGE et à l'immunobuvardage de type Western permet d'identifier les formes immatures (sensibles à l'EndoH et à la PNGase F) et matures (résistantes à l'EndoH, sensibles à la PNGase F) par la chute de la masse moléculaire apparente associée à la perte de l'oligosaccharide.

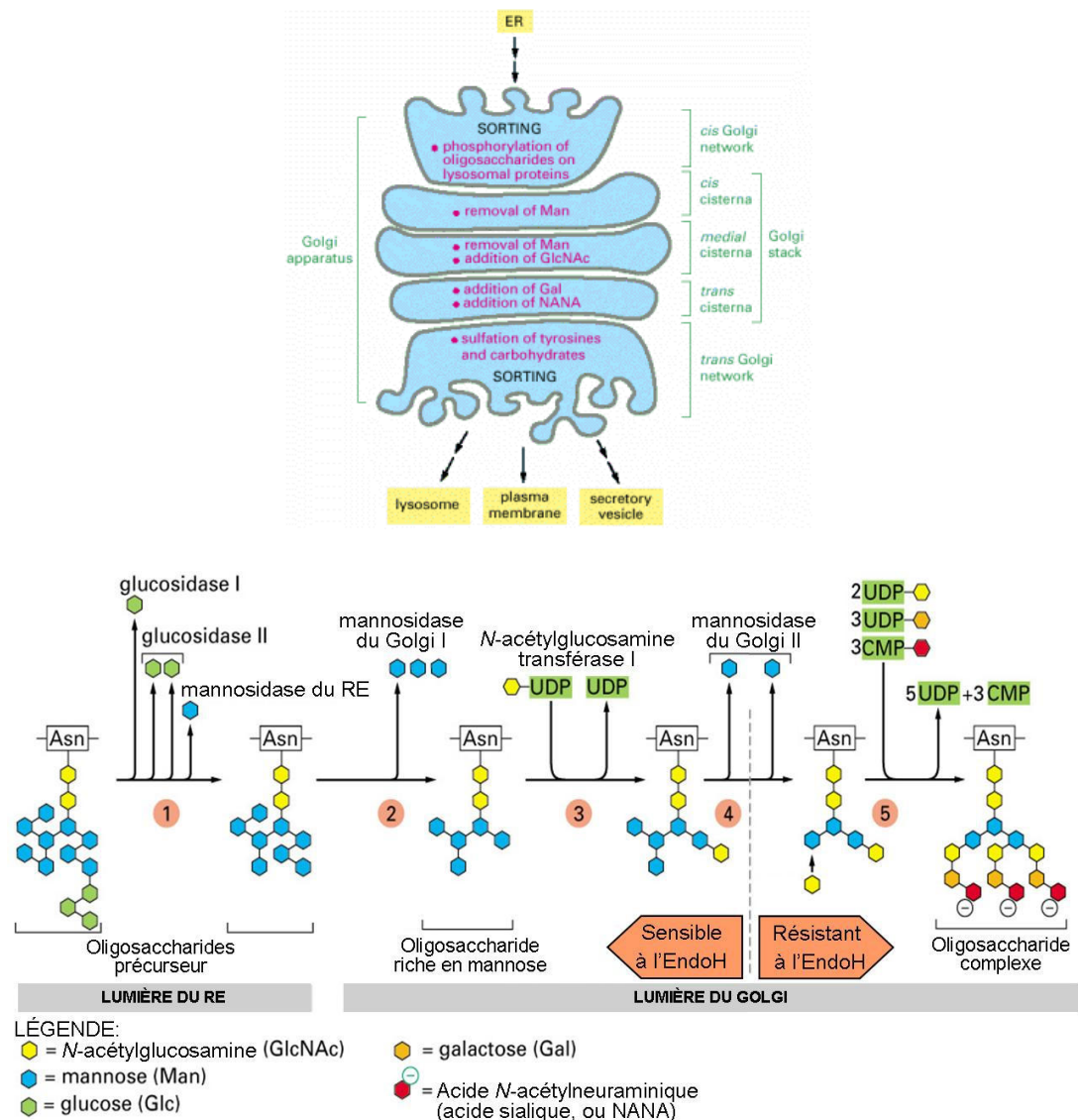


Figure 1.3. Évolution des N-polyosides de protéines passant par la voie de sécrétion. La modification de l'oligosaccharide précurseur transféré sur la néo-protéine commence au niveau du RE par le retrait des glucoses terminaux par l'action séquentielle des glucosidase I et II dans le RE. Le retrait d'un mannose spécifique par la mannosidase du RE précède l'export de la protéine bien repliée vers le Golgi (1). La mannosidase du Golgi I retire alors 3 mannoses au noyau de l'oligosaccharide précurseur. L'oligosaccharide obtenu est qualifié de « riche en mannose » (2). L'ajout actif d'un GlcNAc par la GlcNAc transférase I (3) permet ensuite le retrait de 2 mannoses par la mannosidase du Golgi II (4). À cette étape ce produisant dans le Golgi médian, le lien osidique entre les 2 GlcNAc du noyau de l'oligosaccharide devient résistant à l'hydrolyse par une endoglycosidase spécifique, l'endoglycosidase H (EndoH). Étant donné que les structures subséquentes de la voie de transformation sont aussi résistantes à l'EndoH, cette enzyme est souvent utilisée pour distinguer les oligosaccharides de type riche en mannose (high-mannose) de ceux complexes. Finalement, un nombre variable de résidus sucres (comme le GlcNAc, le galactose et l'acide sialique), allant de quelques uns à 10 et plus, sont ajoutés activement (5). Chaque étape de cette voie de transformation est dépendante de la précédente, ce qui en fait une voie très ordonnée [22].

1.1.3 La famille des récepteurs mélanocortine

Le MC4R fait partie de la famille des récepteurs de la mélanocortine (MCR), qui compte 5 membres au total et dont les gènes ont été clonés au début des années 1990 [11].

1.1.3.1 Rôles physiologiques et expression

Les MCR sont impliqués dans une variété de fonctions physiologiques. Le MC1R, aussi connu sous le nom de récepteur d'hormone stimulant les mélanocytes (MSH-R), est principalement exprimé dans ce type cellulaire où il régule la pigmentation. Le MC2R est plutôt relié à la glucocorticoïdogenèse dans le cortex surrénal, tandis que le MC5R est largement exprimé dans les tissus périphériques et est impliqué dans la régulation de la fonction des glandes exocrines. Les MC3R et MC4R sont principalement localisés dans le cerveau où ils jouent un rôle dans la régulation centrale de l'homéostasie énergétique [23]. Le MC4R étant le centre d'intérêt de ce mémoire, il sera discuté en détails à la section 1.1.4.

1.1.3.2 Les ligands mélanocortines

Il est accepté dans la communauté scientifique que l'activation de la protéine G est engendrée par le changement conformationnel du RCPG (auquel elle est associée) induit par la liaison du ligand [24]. Ce ligand est alors dit agoniste pour la voie de signalisation activée. Les ligands qui ont la capacité de bloquer l'augmentation de l'activité du récepteur normalement induite par un agoniste sans affecter l'activité basale du RCPG (ou activité constitutive, soit le niveau d'activité basal du récepteur sans activation par un ligand) sont dits antagonistes. Si les ligands inhibent aussi l'activité constitutive, ils sont dits agonistes inverses (figure 1.4).

Les mélanocortines, soit l' α -MSH, la β -MSH, la γ -MSH et l'hormone adrénocorticotrope (ACTH), constituent les 4 ligands agonistes naturels des MCR et sont issus du clivage post-traductionnel de la pro-opiomélanocortine (POMC) par des endopeptidases, soit les prohormones convertases 1 et 2 (voir figure 1.5). Comme il peut être observé au tableau I, chaque sous-type de récepteur a son ligand préférentiel, selon leurs sites d'expression et leurs affinités respectives [4, 25]. Le MC4R, lui, est principalement activé par l' α -MSH.

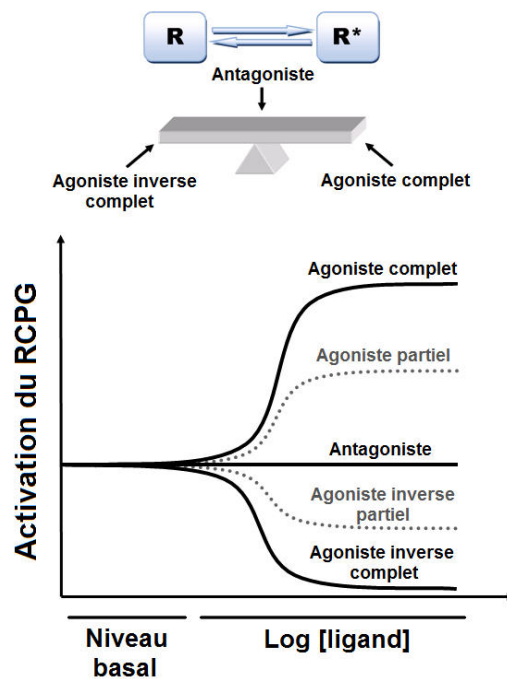


Figure 1.4. Notions d'agonisme, antagonisme et agonisme inverse. Le point d'équilibre basal entre la conformation inactive (R) et la conformation active (R*) pour une voie de signalisation définit le niveau d'activité constitutive du récepteur. L'agoniste stabilise la conformation active du récepteur, l'antagoniste stabilise la conformation basale liée à l'activité constitutive et l'agoniste inverse stabilise la conformation inactive.

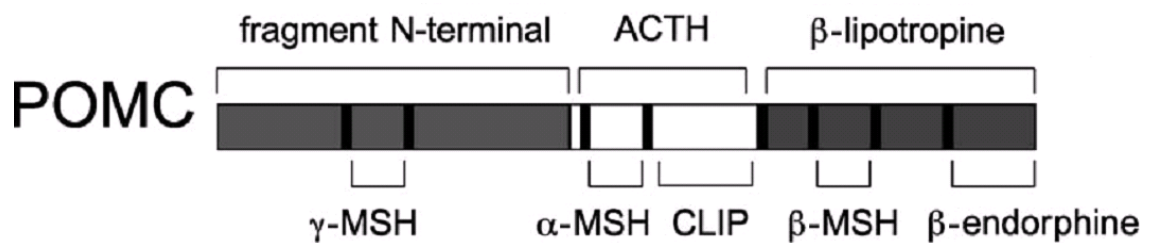


Figure 1.5. La pro-opiomélanocortine et ses dérivés de clivage post-traductionnel [4].

	Puissance relative de l'activation par l'agoniste (ligands principaux en gras)	Antagoniste	Rôle	Expression tissulaire chez l'humain	Réf.
MC1R	α-MSH =ACTH> β -MSH> γ -MSH	Agouti	Pigmentation	Peau (mélanocytes, sébocytes), monocytes, placenta, testicules, ovaires, cerveau	[12, 26]
MC2R	ACTH	Agouti	Steroïdogénèse	Surrénale, peau, testicules	[26]
MC3R	α-MSH = β -MSH= γ-MSH =ACTH	AgRP	Homéostasie énergétique	Cerveau (hypothalamus), placenta, intestin, Coeur, testicules	[27-29]
MC4R	α-MSH =ACTH> β -MSH> γ -MSH	AgRP , agouti	Homéostasie énergétique, activité érectile	Cerveau (répandu, plus forte expression au niveau de l'hypothalamus) Peau (glandes lacrymales, sébacées, eccrines, apocrines),	[1, 30]
MC5R	α-MSH > ACTH > β -MSH> γ -MSH	Agouti	Sécrétion de lipides par les glandes sébacées	surrénale, adipocytes, lymphocytes, hypophyse, poumons, reins, ovaires, utérus, sein, testicules	[31-35]

Tableau I. Vue globale des ligands endogènes, du site d'expression et de la fonction des différents MCR [4, 25].

En plus d'être régulée par ces ligands de type agoniste, la famille MCR est la seule connue à ce jour à être aussi régulée par des antagonistes naturels [36]. En effet, l'agouti et la protéine reliée à l'agouti (AgRP) sont des antagonistes compétitifs des mélanocortines (qui luttent pour le même site de liaison sur le récepteur) qui inhibent l'activation de la voie de l'adénylate cyclase induite via les MCR [37, 38]. L'agouti est exprimé en périphérie, tandis que l'AgRP est principalement exprimé au niveau du cerveau (hypothalamus et noyau subthalamique) [38]. Plusieurs études démontrent que l'AgRP agisse en tant qu'agoniste inverse en système *in vitro* [38-40], ce qui a nouvellement été confirmé *in vivo* [41, 42]. D'ailleurs, il a récemment été découvert que certaines terminaisons nerveuses des neurones AgRP font des projections vers des neurones MC4R qui ne sont pas innervés par les terminaisons MSH. Ceci laisse croire que l'AgRP pourrait moduler à la baisse l'activité du MC4R en absence de MSH endogène [41].

Ce phénomène unique de régulation d'un même récepteur par un agoniste et un antagoniste (ou agoniste inverse) endogène met en évidence la régulation fine de la fonction des MCR [25].

Lorsque cette régulation est altérée, de graves conséquences peuvent survenir. Dans le cas du MC4R, l'obésité morbide précoce engendrée par la mutation d'un seul allèle dans le gène de ce récepteur exemplifie bien ce problème. Dans la prochaine section, nous nous concentrerons sur le MC4R, qui est la cible de la présente étude.

1.1.4 Le rôle du MC4R dans le système nerveux central

1.1.4.1 Expression

Tel que mentionné précédemment, le MC4R joue un rôle dans le contrôle de l'homéostasie énergétique, soit en contrôlant la prise alimentaire et la dépense énergétique, au niveau du système nerveux central. Le MC4R est principalement exprimé au niveau du cerveau où il est réparti de façon plutôt homogène (tableau II). Il est toutefois plus fortement exprimé au niveau de l'hypothalamus (axe hypothalamo-hypophysaire) et du tronc cérébral (système nerveux autonome), ce dernier site suggérant l'implication de ces récepteurs dans la voie autonome [11] (figure 1.6).

Partie du cerveau	Expression MC4R
Tronc cérébral	Colliculus supérieur Noyau du faisceau optique Noyau dorsal moteur du nerf vague (DMV) Noyau Rouge Noyau réticulaire parvocellulaire
Hypothalamus	Noyau suprachiasmatique préoptique Noyau périventriculaire antéroventral Noyau supraoptique Noyau paraventriculaire (PVN) Aire préoptique médiale Noyau préoptique (partie antéroventrale) Noyau ventromédian (partie ventrolatérale) Noyau dorsomédian (DMH) Noyau tubéromamillaire Aire hypothalamique latérale (LH)
Thalamus	Noyau suprageniculatis
Striatum	Fundus du Striatum
Septum	Partie intermédiaire du septum latéral Septum médian Noyau du lit de la strie terminale Noyau septo-hippocampal Organe subfornical
Cortex	Plusieurs régions
Amygdale	Plusieurs régions
Hippocampe	Plusieurs régions, région CA3 en particulier

Tableau II. Sites principaux d'expression du MC4R dans le cerveau du rat [11].

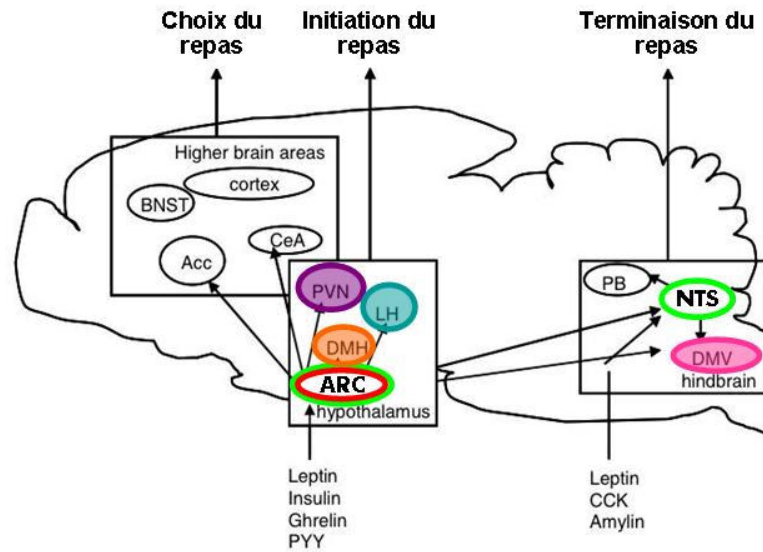


Figure 1.6. Expression des gènes POMC et AgRP dans le cerveau et innervation des neurones les exprimant. Neurones POMC/CART : vert. Neurones AgRP : rouge. Sites principaux innervés : le noyau paraventriculaire (PVN), l'aire hypothalamique latérale (LH), le noyau dorsomédian (DMH), le noyau du faisceau solitaire (NTS) et le noyau dorsal moteur du nerf vague (DMV).

1.1.4.2 Mécanisme d'activation

Au niveau du cerveau, la régulation des neurones exprimant le MC4R se fait principalement par des neurones du noyau arqué exprimant soit la POMC (neurones POMC/CART), soit l'AgRP (neurones AgRP/NPY) (figure 1.6). Des terminaisons nerveuses se rendent à divers endroits dans le cerveau, dont plusieurs noyaux associés à la régulation de l'homéostasie énergétique tels que le noyau paraventriculaire (PVN), l'aire hypothalamique latérale (LH) et le noyau dorsomédian (DMH) de l'hypothalamus ainsi que le noyau dorsal moteur du nerf vague (DMV) du tronc cérébral [43]. La sécrétion des ligands agonistes du MC4R par les neurones POMC/CART, stimulée par divers signaux sanguins ou synaptiques (leptine [44], insuline [45], PYY [46], 5-HT [47]), active la voie de l'adénylate cyclase via le couplage du MC4R à la protéine G_s . L'accumulation d'AMPc résultante de l'activation de cette voie de signalisation active la protéine kinase A (PKA), qui peut avoir un effet à divers niveaux, dont la promotion de la transcription de gènes en activant entre autres la protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc (CREB). Les cibles de la PKA ne sont pas encore révélées, toutefois, il est suspecté que le facteur de transcription Sim1 (Single-Minded 1) en fasse partie. En effet, il est suggéré que Sim1 joue un rôle dans la signalisation du MC4R au niveau du PVN, où ils sont exprimés dans

les mêmes neurones [48-50]. Malgré l'ignorance du mécanisme précis, il est connu que la voie de signalisation du MC4R mène ultimement à la transmission d'un signal anorexigène, soit l'inhibition de la faim, et à l'augmentation de la dépense d'énergie (figure 1.7). Il a été montré que l'activation du MC4R peut aussi stimuler l'activation de la voie ERK (extracellular signal-regulated kinases), impliquant que de multiples voies de signalisation peuvent peut-être exister au-delà de la voie traditionnelle de l'AMPc [51].

Le signal anorexigène induit par l' α -MSH est inhibé par la sécrétion d'AgRP par les neurones AgRP/NPY qui est stimulée entre autres par la ghréline, un peptide orexigène (stimulant la faim) sécrété par l'estomac pour activer la prise alimentaire [52]. Les neurones AgRP/NPY ont aussi une action inhibitrice sur les neurones POMC/CART [53].

Il est important de faire mention que tous les ligands naturels étant des protéines imperméables à la membrane plasmique, les MCR se doivent d'être exprimés à la surface cellulaire pour pouvoir entrer en contact avec leur ligand et ainsi accomplir leur fonction.

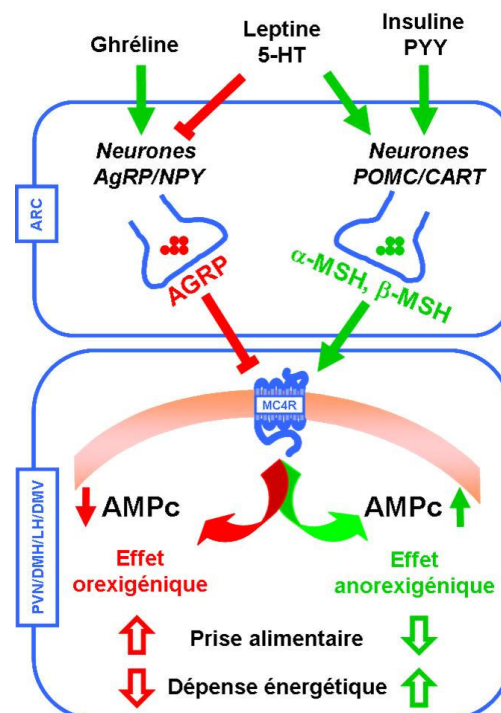


Figure 1.7. Mécanisme d'activation/inhibition du MC4R dans le cerveau. Les flèches vertes indiquent une stimulation tandis que les lignes rouges indiquent une inhibition. ARC : noyau arqué. PVN : noyau paraventriculaire. LH : aire hypothalamique latérale. DMH : noyau dorsomédian. NTS : noyau du faisceau solitaire. (DMV) noyau dorsal moteur du nerf vague.

1.1.4.3 Confirmation du rôle

L'implication du MC4R dans le contrôle de la prise alimentaire et de la dépense énergétique a été confirmée par des essais pharmacologiques et génétiques. L'injection intracranienne et l'administration périphérique d'agonistes ou d'antagonistes du MC4R a permis de confirmer l'implication directe du MC4R dans l'homéostasie énergétique. Alors que les agonistes diminuent la prise alimentaire, les antagonistes provoquent l'hyperphagie [54-57].

L'abolition des gènes codant pour les ligands du MC4R confirme leur implication dans la voie de signalisation de ce récepteur. Dans le cas de la délétion du gène de l'AgRP, une hypophagie est observée, chez l'adulte seulement [58]. La délétion des neurones AgRP/NPY du noyau arqué a un effet beaucoup plus marqué en menant à une hypophagie sévère [59, 60] pouvant même atteindre l'aphagie [61]. Ces neurones ayant une action inhibitrice sur les neurones POMC/CART hypothalamiques, la surexcrétion de POMC participe probablement au phénotype [53]. La délétion du gène *pomc* augmente la prise alimentaire par l'absence de stimulation de l'effet anorexigène du MC4R et provoque l'obésité morbide précoce (figure 1.8) [43].

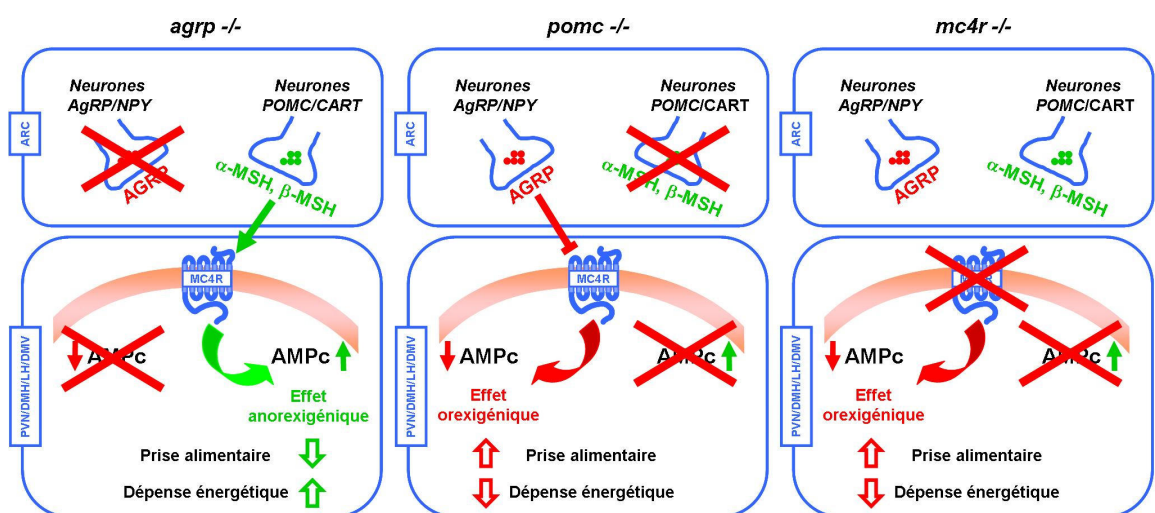


Figure 1.8. Confirmation de l'implication des éléments de la voie de signalisation du MC4R dans l'homéostasie énergétique.

Le rôle du MC4R lui-même a été confirmé par l'ablation du gène *mc4r* chez la souris. En effet, les souris homozygotes pour la délétion du gène *mc4r* (*mc4r* $-/-$) montraient une obésité caractérisée par l'hyperphagie, l'augmentation de l'adiposité, l'augmentation de la croissance longitudinale, le maintien de la masse normale de masse maigre, l'hyperinsulinémie et l'hyperleptinémie [2]. La délétion hétérozygote (*mc4r* $+/-$) montre un phénotype intermédiaire entre le *mc4r* $-/-$ et le *mc4r* de type sauvage, indiquant ainsi la codominance de l'allèle délété [2, 9].

L'implication du MC4R hypothalamique dans le contrôle de la prise alimentaire seulement (et non de la dépense énergétique) a été mise en évidence par un modèle de souris loxTB-*mc4r*. La transcription normale du *mc4r* a été bloquée par l'insertion d'une séquence bloquant la transcription (TB) flanquée d'éléments de recombinaison loxP (loxTB) entre le site d'initiation de la transcription et l'ATG du gène *mc4r*, par recombinaison homologue. La Cre-recombinase permettant la délétion de la séquence TB comprise entre 2 sites loxP et Sim1 étant fortement exprimé dans le PVH, ces éléments ont été utilisés pour réactiver localement l'expression du *mc4r*. La restauration de la fonction de l'allèle modifiée a pu être ciblée au PVH par le croisement des souris loxTB-*mc4r* avec des souris exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur du gène Sim1. Seules les cellules coexprimant le MC4R et Sim1 de façon endogène ont pu restaurer l'expression du *mc4r*, puisque ces gènes sont toujours sous le contrôle des promoteurs endogènes. La réactivation locale du MC4R dans le PVH a permis de diminuer la prise alimentaire, sans affecter la régulation de la dépense d'énergie (figure 1.9).

1.1.4.3.1 Mutations ponctuelles du MC4R chez l'humain

Le phénotype obèse des modèles de souris *knock out* du MC4R est retrouvé chez des sujets humains ayant une mutation ponctuelle dans le gène *mc4r* [9]. Cent-trente mutations naturelles du gène du MC4R survenant chez l'homme ont été identifiées jusqu'à présent [3] et entraînent l'apparition d'une obésité précoce sévère.

L'obésité morbide précoce (OMP) peut aussi être causée par des mutations ponctuelles dans d'autres gènes impliqués de près ou de loin dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. Par exemple, les mutations de la leptine (LEP), du récepteur de la leptine

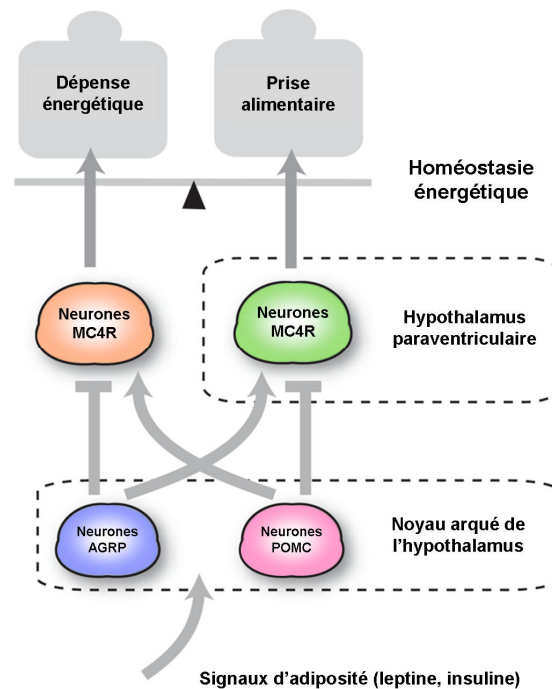


Figure 1.9. Le MC4R du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus est impliqué dans le contrôle de la prise alimentaire seulement [62].

(LEPR), de la proopiomélanocortine (POMC), de la prohormone convertase 1 (PC1), du récepteur mélanocortine de type 3 (MC3R) et du *single-minded homolog 1* (SIM1), causent l'OMP [3], mais les mutations ponctuelles chez le MC4R restent la forme la plus commune de l'obésité monogénique, en atteignant jusqu'à 6% des cas d'OMP dans certaines populations [3].

Alors que certaines mutations affectent le site de liaison du ligand ou de la protéine G, environ 80% des formes mutantes du MC4R humain comportant une mutation de type faux-sens sont incapables de signaler dû à une rétention intracellulaire du récepteur [2] (Figure 1.10). Il a été proposé que le récepteur muté soit retenu par le système de contrôle de qualité de la cellule dû à son mauvais repliement. Dans certains cas, le mauvais repliement engendré par la mutation ponctuelle n'affecterait pas en soi le potentiel de signalisation du récepteur [63]. La perte de fonction ne serait attribuée qu'à l'absence du récepteur à la surface cellulaire, dont l'acheminement à la membrane plasmique est entravé.

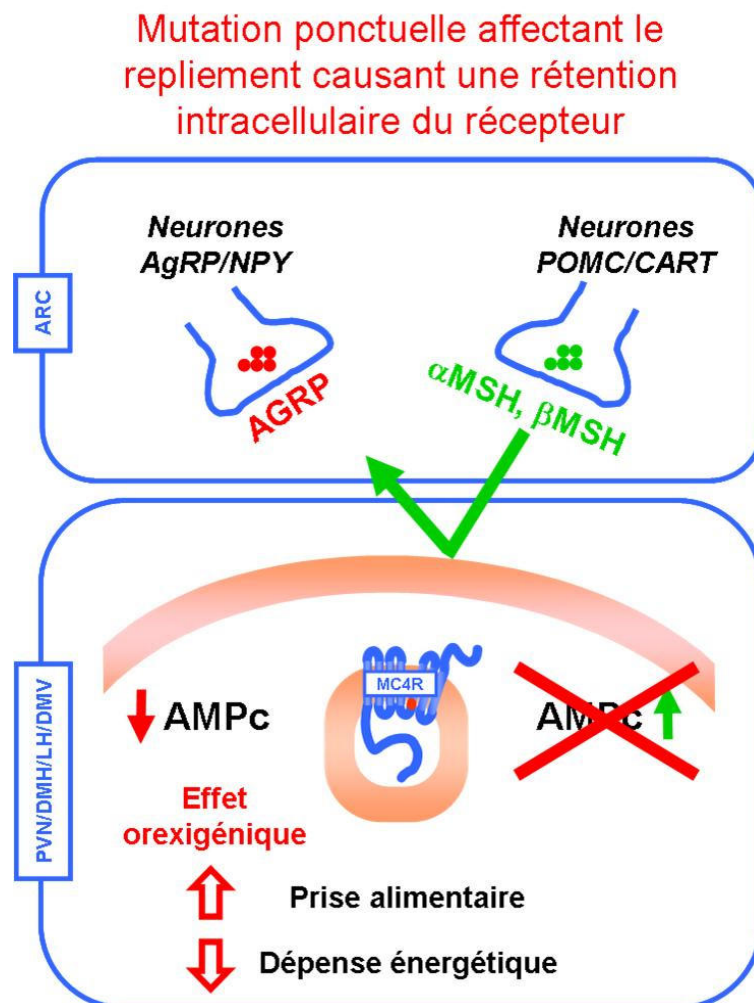


Figure 1.10. La rétention intracellulaire du MC4R causée par une mutation ponctuelle mène à l'augmentation de la prise alimentaire et à la diminution de la dépense énergétique.

1.2 L'acheminement des RCPG à la membrane plasmique

Afin d'être exprimé à la membrane plasmique, le MC4R doit passer par la voie de sécrétion de la cellule. Il passera par diverses étapes de contrôle de qualité, du RE à l'appareil de Golgi, avant d'être acheminé à la surface cellulaire.

Le système de contrôle de qualité (SQC) est l'ensemble des processus de triage moléculaire des protéines néo-synthétisées [64]. Les principales stratégies incluent la rétention dans le RE, la dégradation associée au RE (ERAD), le réacheminement vers le RE à partir d'organites en aval et l'extraction de l'appareil de Golgi vers le lysosome (figure 1.11). Ce triage est régi par différents groupes de protéines et est principalement basé sur la conformation de la protéine néo-synthétisée. Au niveau du réticulum endoplasmique (RE), les chaperones (ou protéines chaperons) assistent les néo-protéines dans leur repliement et représentent le point de contrôle le plus stringant [65].

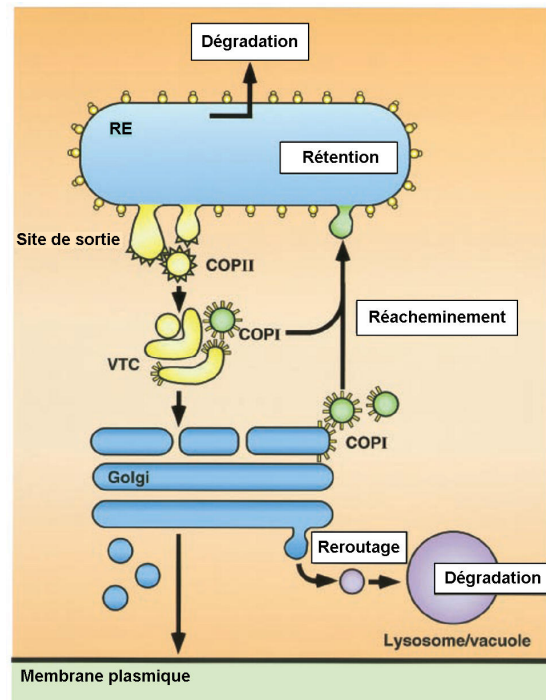


Figure 1.11. Les différents points de contrôle de système de contrôle de qualité.

1.2.1 L'entrée dans la voie de sécrétion

Dès la traduction de l'ARNm du RCPG, le peptide signal émergeant du ribosome recrute la particule de reconnaissance de la séquence signal (*signal peptide recognition protein* ou SRP). Le SRP recrute à son tour le récepteur de SRP, qui permettra le recrutement du complexe ARNm-Ribosome-SRP au translocon (complexe Sec61) du RE. Cette série d'interaction permet donc l'arrimage du ribosome à la membrane du RE (voir figure 1.12) [66]. La néo-protéine est alors insérée dans la membrane du RE de manière co-translationnelle et les séquences consensus Asn-X-Ser/Thr exposées à la lumière du RE sont glycosylées par l'oligosaccharyl transférase (OST) qui catalyse le transfert d'un oligosaccharide précurseur ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) à partir du dolichol vers le résidu Asn [16, 67].

Tel que mentionné dans la section 1.1.2.1.2.4., la N-glycosylation est l'une des modifications les plus communes des protéines de la voie de sécrétion [15]. Elle joue un rôle important dans le système de contrôle de qualité (SCQ) en agissant comme point d'ancrage : elle permet le recrutement des protéines N-glycosylées par des chaperones liant spécifiquement les glycoprotéines, soit la calnexine (CNX, une protéine membranaire) et son homologue luminal, la calréticuline (CRT).

Toutefois, les glucosidases I et II, des enzymes dans la lumière du RE, doivent préalablement cliver 2 des 3 glucoses de l'oligosaccharide précurseur afin de permettre l'interaction du RCPG avec le domaine lectine (liant les sucres, et dans ce cas, l'oligosaccharide précurseur monoglycosylé) de ces chaperones et ainsi faire entrer la glycoprotéine dans le premier point de contrôle du SCQ, le cycle de la calnexine.

1.2.1.1 Le cycle de la calnexine

La calnexine est une chaperone résidente du RE ancrée dans la membrane par son domaine transmembranaire qui aide la néo-glycoprotéine à adopter une conformation qui la rendra éventuellement fonctionnelle en favorisant l'interaction avec plusieurs autres chaperones et co-chaperones, en prévenant l'agrégation irréversible des protéines immatures et en retenant les protéines mal repliées dans le RE [65, 68].

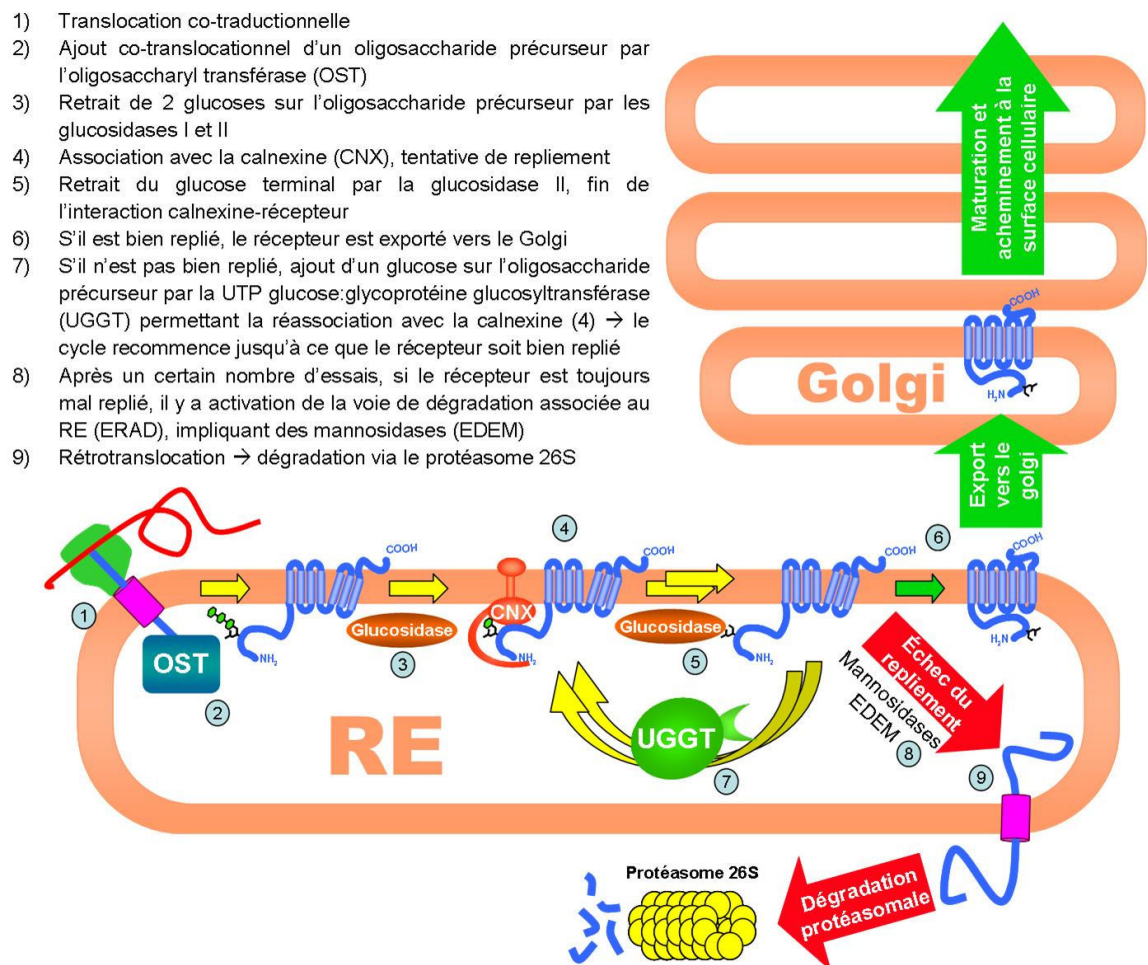


Figure 1.12. Le cycle de la calnexine. Inspiré du livre *Molecular Biology of the Cell*, 4^e édition [22].

Tel que mentionné, la calnexine lie la néo-glycoprotéine exposant un ou plusieurs oligosaccharides précurseurs monoglycosylés via son domaine lectine. La protéine néo-synthétisée pourra aussi interagir avec une série de chaperones dépendamment de ses besoins, sans toutefois nécessairement interagir avec chacune d'entre elles. Les différentes chaperones présentes dans le RE ont des fonctions redondantes pour assurer la réussite du repliement des protéines néo-synthétisées et agissent comme senseurs dans le RE [69]. Par exemple, BiP et Grp94 stabilisent les protéines mal repliées en liant les parties hydrophobes exposées à la lumière du RE, et les protéines disulfure isomérase (PDI) et thioloxydoréductase ERp57 catalysent la formation de ponts disulfure (S-S) transitoires stabilisant la protéine et favorisant son repliement [70]. Ces ponts S-S, de même que la N-glycosylation, sont stabilisateurs et ainsi aident la glycoprotéine à atteindre sa conformation fonctionnelle [69, 71].

Pour mettre fin à l'interaction entre la néo-protéine et la calnexine, la glucosidase II viendra cliver le glucose terminal de l'oligosaccharide précurseur (figure 1.12). Si le repliement n'est pas encore complet, une enzyme luminale agissant en tant que senseur de repliement, l'UDP-glucose:glycoprotéine glucosyltransférase (UGGT), le reconnaîtra et ajoutera un glucose à l'oligosaccharide précurseur afin de permettre le retour au cycle de la calnexine. Ce cycle se répétera jusqu'à ce que la protéine soit bien repliée, sinon elle sera redirigée vers la voie de dégradation associée au RE (ERAD).

1.2.1.1.1 Réussite du repliement

Une fois le bon repliement réussi, la protéine est envoyée vers l'appareil de Golgi pour continuer sa maturation. Pour être transportées vers la membrane plasmique, les glycoprotéines étant sorties avec succès du cycle de la calnexine sont souvent accompagnées par des protéines d'export. Une lectine hautement spécifique pour les oligosaccharides riches en mannose, ERGIC-53, joue ce rôle de récepteur-cargo. Elle fait la navette entre le RE et le compartiment intermédiaire entre le RE et le Golgi (ERGIC) en liant les COPII tapissant les vésicules de sortie vers le Golgi [72-74].

Une fois dans le Golgi, les protéines sont éventuellement envoyées vers la membrane plasmique ou dans des vésicules de sécrétion, si elles ne sont pas redirigées vers le RE ou le lysosome par le système de contrôle de qualité du Golgi [65, 69, 75]. En effet, certaines protéines peuvent quitter le RE par erreur et se rendre à l'ERGIC et/ou au Golgi.

L'existence d'un point de contrôle post-RE assure le transport rétrograde des glycoprotéines mal localisées vers le RE [75]. Il est suspecté que VIP36, un homologue d'ERGIC-53 retrouvé dans l'ERGIC et le *cis*-Golgi [75], joue un rôle dans ce point de contrôle.

Le transport vers le Golgi via ERGIC-53 est une voie plutôt générale qui s'applique à la plupart des glycoprotéines. Toutefois, ce système général n'est pas toujours suffisant. En effet, certaines protéines nécessitent la présence de transporteurs spécifiques pour réguler leur acheminement à la membrane plasmique, dont RAMP pour le récepteur similaire au récepteur de la calcitonine (CRLR) [76], MRAP pour le MC2R [77], RTP4 pour le μ - δ OR [78], RanBP2 pour la rhodopsine [79], RTP1 et 2 pour les récepteurs odorants [79] et DRiP78 pour le D1R [80, 81] n'en sont que quelques exemples. DRiP78 pourrait néanmoins avoir un rôle plus général, étant donné qu'il interagit avec la séquence FxxxFxxxF du D1R, qui est conservée chez plusieurs autres RCPG [81]. Par exemple, l'interaction de DRiP78 avec le récepteur muscarinique [82] et le V2R a été confirmée. Il a été récemment suggéré que DRiP78 joue aussi un rôle de protéine chaperon dans l'assemblage des sous-unités Gy de la protéine G [83].

1.2.1.1.2 Échec du repliement

Toutefois, si le repliement correct de la protéine dans le RE échoue, l'oligosaccharide de la protéine sera éventuellement déglycosylé partiellement par la mannosidase I pour atteindre la forme Man8. Cette déglycosylation est considérée comme la « minuterie » du repliement, en faisant diminuer l'affinité pour la calnexine et ainsi en faisant rediriger la protéine vers une autre lectine potentielle, EDEM (*ER-degradation enhancing mannosidase*), qui guide la protéine mal repliée vers la voie de dégradation associée au RE (ERAD) [84]. Des résultats récents suggèrent qu'EDEM puisse être une mannosidase et que cette protéine a une activité de chaperone [85, 86]. Suite à l'interaction avec EDEM, la protéine est rétrotransloquée dans le cytosol par le complexe Sec61 pour être déglycosylée par une N-glycanase, polyubiquitinée par un complexe E2/E3 ligase associé à la membrane du RE et acheminée vers le protéasome 26S pour la dégradation [68]. La N-glycosylation est donc aussi un point de contrôle pour la voie ERAD.

En empêchant les protéines ayant un défaut structural d'atteindre leur cible d'expression, le but du système de contrôle de qualité est d'éliminer les protéines indésirables. Or, le

système de contrôle de qualité peut parfois être trop stringent : dans plusieurs cas, une seule mutation ponctuelle, sans qu'elle n'affecte nécessairement la fonctionnalité, cause la rétention intracellulaire. De par leur absence à la membrane plasmique, ces récepteurs potentiellement aptes à signaler voient leur fonctionnalité abolie. Des maladies associées à l'inactivation d'un récepteur causée par une rétention intracellulaire due à un problème de repliement de la protéine se déclarent alors et font partie des maladies dites conformationnelles.

1.3 Les maladies conformationnelles

Plusieurs maladies sont attribuées à des défauts conformationnels protéiques impliquant des enzymes, des récepteurs ou encore des canaux ioniques. Dans le cas des protéines membranaires, l'abolition de la fonction du récepteur est souvent principalement causée par la rétention intracellulaire. Ces maladies sont dites conformationnelles dû à la présomption que l'origine de la rétention soit engendrée par un mauvais repliement de la protéine mutante. Parmi la grande famille des RCPG destinés à la surface cellulaire, plusieurs mutations ponctuelles de type faux-sens causant la rétention intracellulaire ont été associées à des maladies. Plusieurs exemples sont cités au tableau III.

Étant donné que le système de contrôle de qualité retient une protéine selon un critère structural plutôt que fonctionnel (étant donné qu'elle est encore immature [65]), il est possible que le récepteur mutant, avec un peu d'aide à se replier, puisse recouvrir sa fonctionnalité s'il arrive à se rendre à la membrane plasmique. Cela implique que la mutation n'apporte pas de défaut majeur de signalisation invalidant la liaison du ligand ou des effecteurs. La présence du récepteur muté à la surface cellulaire pourrait alors être suffisante pour assurer sa fonction.

RCPG	Maladie
Récepteur de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) (ou récepteur mélanocortine de type 2 (MC2R))	Résistance familiale à l'ACTH
Récepteur sensible au calcium (CaSR)	Hypercalcémie hypocalciurique familiale Hyperparathyroïdisme néonatal
Récepteur de l'endothéline B (ETBR)	Maladie de Hirschsprung
Récepteur de la gonadolibérine (GnRHR)	Hypogonadisme hypogonasotropique
Récepteur de l'hormone lutéinisante (LHR)	Pseudohermaphroditisme mâle
Rhodopsine	Rétinite pigmentaire
Récepteur de l'hormone stimulant la thyroïde (TSHR)	Hypothyroïdisme congénital
Récepteur V2 de la vasopressine (V2R)	Diabète insipide néphrogénique
Récepteur mélanocortine de type 4 (MC4R)	Obésité morbide précoce

Tableau III. Récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) impliqués dans des maladies conformationnelles [87, 88].

1.4 Stratégie pharmacologique de réchappement des récepteurs mutés

1.4.1 Historique

Il a été observé chez une protéine membranaire, le CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), dont les mutations ponctuelles engendrent la fibrose kystique, que la surexpression du mutant le plus commun ($\Delta 508$) mène à l'apparition de ce canal Cl- fonctionnel à la surface. La saturation du système de contrôle de qualité par la surexpression de la protéine pourrait expliquer la fuite de mutants à la membrane plasmique. Ceci suggère que le $\Delta 508$ est apte à adopter une conformation correcte pour assurer sa fonction. Le problème résiderait donc en la trop grande stringence du système de contrôle de qualité [89].

Toutefois, il est possible de déjouer le système de contrôle de qualité. En effet, l'expression du CFTR à la surface a pu être augmentée en abaissant la température d'incubation de cellules exprimant le $\Delta 508$ à 30 C [90]. La baisse de température diminue la cinétique de repliement, ce qui augmente son efficacité. Aussi, l'utilisation de chaperones chimiques tels que le gly cerol et le DMSO mime l'effet de la baisse de

température, en supposant que la liaison non spécifique de ces composés stabilise les intermédiaires de repliement. L'effet de chaperones chimiques a aussi été observé pour plusieurs autres protéines [91], dont AQP2 [92], ataxin-3 [93], α -synucléine [94], β -amyloïde [95], CBS [96], PAH [97], BCKD [98] et p53 [99].

Loo et Clarke ont ensuite mis en évidence que des ligands spécifiques à une protéine peuvent aussi favoriser son expression à la surface cellulaire [100]. Ceci a été démontré avec la P-glycoprotéine 1, un transporteur dépendant de l'énergie à la membrane plasmique qui interagit avec une grande variété d'agents cytotoxiques. Les mutants artificiels de la P-glycoprotéine 1 générés par le groupe sont retenus dans le RE sous la forme d'intermédiaires biosynthétiques glycosylés avec un oligosaccharide précurseur (voir figure 1.3). Afin de réchapper sélectivement la P-glycoprotéine 1, des substrats ou modulateurs spécifiques qui lient cette protéine, tels que la capsaïcine, la cyclosporine, la vinblastine et le verapamil, ont été testés. Suite au traitement avec ces divers composés, une P-glycoprotéine 1 fonctionnelle et glycosylée de manière complexe apparaît à la surface cellulaire. Cette restauration de l'expression à la membrane plasmique et de la fonctionnalité est spécifique étant donné que les ligands de la P-glycoprotéine 1 se sont avérés inefficaces sur le mutant $\Delta 508$ du CFTR. Le rétablissement de l'expression à la surface cellulaire est probablement attribué cette fois-ci à la stabilisation d'une conformation favorable à l'acheminement à la membrane plasmique de la protéine ciblée de manière spécifique [100]. Ce mécanisme d'action, à la différence des chaperones chimiques, implique le concept de sélectivité pharmacologique : seul le repliement de la protéine sélectivement ciblée par le ligand sera influencée [101].

L'équipe du Dr. Michel Bouvier a par la suite appliqué cette découverte aux RCPG. En effet, le groupe a identifié des petites molécules antagonistes du récepteur V2 de la vasopressine (V2R) aptes à rétablir l'expression à la surface cellulaire et la fonctionnalité de récepteurs mutés. Ces composés, de par leur mode d'action, ont été baptisées « chaperones pharmacologiques » [102]. À la différence des ligands naturels, les chaperones pharmacologiques (CP) sont des composés lipophiles capables de traverser les membranes cellulaires pour lier la protéine cible là où elle est retenue.

1.4.1.1 Le diabète insipide néphrogénique

Le V2R est un RCPG impliqué dans la réabsorption d'eau et la concentration de l'urine suite à la liaison de l'hormone antidiurétique arginine vasopressine (AVP) [102]. Dans le cas d'une perte de fonction du V2R, des symptômes de polyurie (volume d'urine anormal) et polydipsie (soif exagérée accompagnée d'une grande prise d'eau) indiquent l'apparition du diabète insipide néphrogénique (DIN).

La grande variété de mutations ponctuelles de type faux-sens trouvées chez les patients DIN causant la rétention intracellulaire du V2R et leur dispersion sur les différents TM [103, 104] ont d'abord suscité le doute quant à l'efficacité d'un seul composé à rattrapper tous ces mutants [102]. Il s'est avéré que la plupart des mutants testés avec la même CP spécifique au V2R ont pu être rattrapés à la surface et regagner partiellement ou totalement leur fonctionnalité (8 mutants avec l'antagoniste peptidomimétique **SR121463**) [102].

En plus de promouvoir l'expression à la surface cellulaire, il a été montré par un marquage métabolique suivi d'une chasse (*pulse chase*) combinée à une digestion avec des endoglycosidases spécifiques (voir section 1.1.2.1.2.4) que la maturation du récepteur mutant *del 62-64* était promue par le traitement avec le **SR121463** [102]. En effet, l'accumulation de formes glycosylées de manière complexe caractéristique du traitement (*processing*) du récepteur par le Golgi a été observée, confirmant l'effet de la CP sur la maturation.

Aussi, une première indication de l'implication du système de contrôle de qualité dans la rétention des V2R mutants a été montrée en 2001, toujours en système *in vitro* : l'association du V2R avec la calnexine était prolongée dans le cas de mutants causant le DIN [105], indiquant que la calnexine puisse être intimement impliquée dans le repliement du V2R et dans la rétention des mutants du V2R dans le RE. Des résultats récemment obtenus dans le laboratoire montrent que le traitement avec la chaperone pharmacologique **SR121463** diminue cette rétention (Bernier *et al.*, non publié).

Quoique l'effet important des CP sur le V2R soit encourageant, la démonstration en système *in vivo* est l'étape ultime pour confirmer le potentiel thérapeutique des composés. L'existence de composés spécifiques au V2R ayant déjà franchi le processus

d'approbation des études cliniques pour une autre application a permis de passer rapidement aux essais chez l'homme. Le potentiel thérapeutique des chaperones pharmacologiques a donc pu être montré chez l'humain, où l'administration du composé SR49059 (un antagoniste du V1aR ayant aussi une affinité pour le V2R) a permis de réduire la polyurie et la polydipsie associée au diabète insipide néphrogénique causée par les V2R mutants [106]. La preuve de concept que les CP représentent une avenue prometteuse pour le traitement du DIN nous fait entrevoir la possibilité d'appliquer ce principe à d'autres maladies conformationnelles.

Comme de fait, bien que dans le cas du V2R il y ait spécificité d'une CP particulière à un récepteur précis, le principe de l'action de ligands ayant une sélectivité pharmacologique a pu être transposé à d'autres RCPG de par la similarité structurale des membres de cette grande famille. En effet, en système *in vitro*, le rétablissement de l'expression à la surface cellulaire et de la fonctionnalité de récepteurs mutants par le traitement avec des ligands pharmacologiques sélectifs a été observé pour le récepteur δ -opioïde (δ OR ou DOR) [107], le récepteur de la gonadolibérine (*gonadotropin-releasing hormone receptor* ou GnRHR) [108, 109], la rhodopsine [110] et le récepteur sensible au calcium [111]. Dans cette étude, nous tenterons d'appliquer ce concept à un autre RCPG, le MC4R, avec comme but ultime la découverte d'un traitement contre l'obésité morbide précoce.

1.5 Mise en situation pour la présente étude

Chez le MC4R, le grand pourcentage de mutations menant à la rétention intracellulaire (80%) ainsi que la forte association de l'OMP avec d'autres maladies représentant un risque élevé de mortalité et morbidité (diabète de type 2, hypertension, ACV, maladies coronariennes et certains types de cancers [3]) en font une cible thérapeutique importante.

Le développement de traitements pour l'OMP est crucial pour le bien-être et la prolongation de la vie des patients atteints. Le principe de chaperone pharmacologique ayant été appliqué à différents RCPG, il est raisonnable d'espérer que ce type de traitement puisse être transposé au MC4R.

1.5.1 Des chaperones pharmacologiques pour le MC4R?

Dans l'optique du développement d'un médicament pour traiter les personnes souffrant d'obésité morbide précoce, une compagnie pharmaceutique états-unienne (Amicus Therapeutics) a sélectionné des composés ayant potentiellement une action de chaperone pharmacologique (CP). Ces CP potentielles sont des ligands peptidomimétiques lipophiles (donc aptes à pénétrer dans la cellule pour aller lier le récepteur là où il est retenu) déjà décrits dans la littérature, qui ont été choisis sur la base de leur sélectivité au MC4R [112-114]. Ces composés (**AT3163**, **AT3186** et **AT3228**) seront considérés comme étant des chaperones pharmacologiques s'ils réussissent à réchapper significativement l'expression à la surface cellulaire et la fonctionnalité du récepteur mutant.

1.5.2 Le mécanisme et le site d'action des composés **AT3163**, **AT3186** et **AT3228**

Si les composés sont bel et bien des CP, nous supposons un mécanisme d'action similaire au **SR121463** sur le V2R. Tel que déjà mentionné, la CP du V2R semble avoir une action précoce dans la maturation, soit au niveau du RE (voir section 1.4.1.1).

1.5.2.1 Caractérisation de la maturation du MC4R en absence et en présence des composés **AT3163**, **AT3186** et **AT3228**

Si les composés favorisent l'expression à la surface cellulaire et la fonctionnalité des mutants du MC4R retenus à l'intérieur de la cellule, nous supposons que les CP favorisent conjointement leur maturation. La maturation des protéines est associée à l'adoption d'une conformation correcte et à l'acquisition des modifications post-traductionnelles intrinsèques à la fonction (ponts disulfures, glycosylation). L'arborisation des N-glycans évoluant parallèlement à la progression du récepteur dans la voie de sécrétion, plus le récepteur approche de la surface cellulaire, plus ses oligosaccharides sont complexes, ainsi, plus la masse moléculaire apparente est augmentée. Le suivi de la N-glycosylation sera alors utilisé comme outil pour suivre la maturation du MC4R. Le traitement avec les CP potentielles, en aidant au repliement de récepteurs retenus dans le RE, pourraient favoriser le trafic des récepteurs mutants vers la surface cellulaire et ainsi favoriser la maturation par l'ajout de résidus de sucres sur les N-glycans.

1.5.2.2 Site d'action des chaperones pharmacologiques

Si les CP rétablissent l'expression à la surface cellulaire par une action précoce dans le processus de maturation, elles devraient favoriser l'export des récepteurs mutants retenus dans RE vers la membrane plasmique. Nous tenterons donc d'identifier le site d'action des CP. Nous supposons une action précoce des CP dans la maturation, soit possiblement au niveau du cycle de la calnexine, tel que nous laisse croire les résultats sur le V2R obtenus dans le laboratoire (données non publiées). Un essai de sortie du RE par transfert d'énergie de résonance par bioluminescence (BRET) a alors été développé en s'inspirant de travaux faits sur le V2R. Le principe de l'essai sera expliqué dans la section résultats.

1.5.3 Choix des mutants

Les nombreuses mutations du MC4R menant à la rétention cellulaire couvrent toute la séquence primaire du RCPG (figure 1.13). Afin de favoriser la détection d'une augmentation importante de la proportion de récepteur à la membrane plasmique suite au traitement avec les CP potentielles, seuls les mutants ayant une faible expression à la surface cellulaire (<50% de la population totale) ont été pris en compte. De ce lot, seules les mutations situées hors du site de liaison du ligand ou de couplage à la protéine ont été considérées. Sur environ 25 mutations parues dans la littérature correspondant à ces critères, les mutations S58C et R165W ont été conservées, puisqu'elles étaient déjà utilisées dans le laboratoire du Dr. Michel Bouvier. La sélection de plus d'une mutation a alors été faite pour augmenter les chances que l'effet de la CP soit général sur les différentes mutations, soit pour s'assurer que l'effet perçu des CP ne soit pas un effet unique à un mutant particulier. Le nombre de mutations étudiées a été limité à 2 pour des fins pratiques.

Une autre mutation, P299H, a aussi été choisie pour cette étude. Cette mutation se situe dans la séquence consensus D/NPXXY qui est connue pour être importante à liaison à la protéine G : la signalisation de ce mutant est donc probablement atténuée ou bloquée. Cette mutation a donc été sélectionnée comme contrôle négatif interne.

Comme nos hypothèses découlent des études faites sur le V2R la plupart des expériences exécutées sur le MC4R seront répétées avec le V2R à titre de contrôle positif. Le mutant

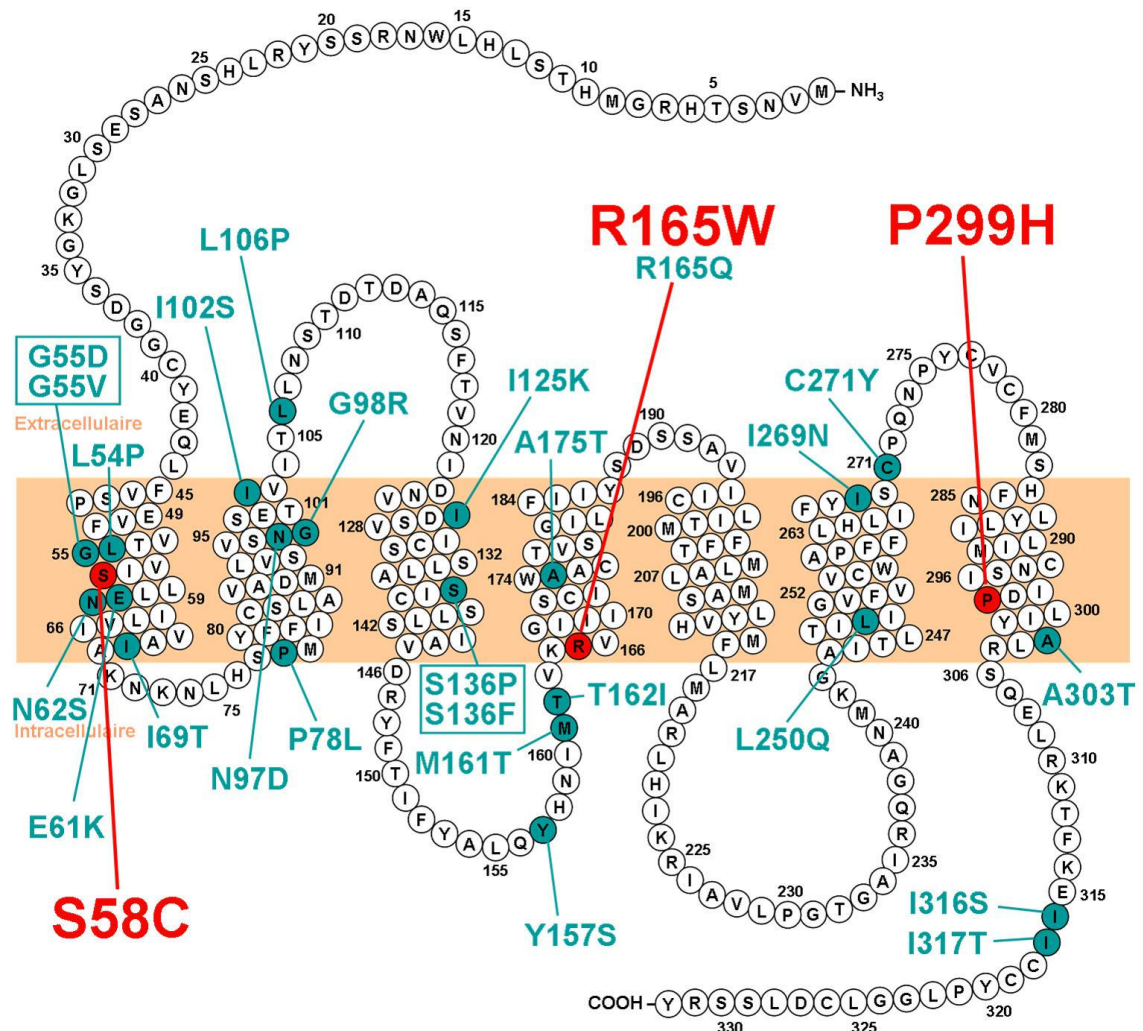


Figure 1.13. Un aperçu de quelques mutations ponctuelles du MC4R humain. Vingt-cinq acides aminés ciblés par des mutations ponctuelles de type faux-sens causant la rétention intracellulaire sont identifiées. Ces mutations sont naturelles et sont retrouvées chez des patients atteints d'obésité morbide précoce associée au MC4R. Les mutations encadrées représentent les 2 mutations possibles pour un même acide aminé. Les mutations identifiées en rouges sont les mutants sélectionnés pour cette étude (S58C, R165W et P299H).

V2R(W164S) a été sélectionné puisqu'il est fortement retenu à l'intérieur de la cellule (<50%) et qu'il est bien réchappé par le **SR121463**.

1.6 Hypothèse et objectifs

1.6.1 Hypothèses

Nous supposons que les composés spécifiques au MC4R **AT3163**, **AT3186** et **AT3228** agiront à titre de chaperones pharmacologiques (CP) sur les formes mutantes du MC4R en réchappant leur expression à la surface cellulaire et leur fonctionnalité, tel que montré avec le composé **SR121463** sur le V2R. En plus de restaurer l'expression à la membrane plasmique, nous formulons l'hypothèse que les CP favorisent la maturation du MC4R.

De plus, nous supposons une action précoce des CP dans la maturation du MC4R, soit possiblement au niveau de l'interaction avec la calnexine dans le RE, sur la base des résultats obtenus dans le laboratoire sur le V2R.

1.6.2 Objectifs

Les objectifs spécifiques de ce mémoire sont :

- 1) La caractérisation de l'action des composés **AT3163**, **AT3186** et **AT3228** en tant que chaperone pharmacologique;
- 2) La caractérisation de la maturation du MC4R en absence et en présence de chaperone pharmacologique;
- 3) L'identification du site d'action des chaperones pharmacologiques.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériel

Le DMEM, l'OptiMEM, le DMEM sans méthionine et cystéine, le sérum foetal bovin, le sérum foetal bovin dialysé, la pénicilline et streptomycine, la glutamine, la géniticine (G418), le DPBS et les plaques 6 puits proviennent de chez Wisent Inc. (St-Bruno, Québec, Canada). Les plaques à 12 puits, les pétris (BD Falcon) et flacons de culture cellulaire (BD Falcon) proviennent de chez BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA). Les plaques à 96 puits blanches à fond opaque CulturPlate™-96 de chez PerkinElmer (Boston, MA, USA) et blanches à fond transparent Costar® de chez Corning Inc. (Corning, NY, USA) ont été utilisées. L'albumine de sérum de bovin (BSA) vient de chez Sigma (St-Louis, MO, USA). Les enzymes endoglycosidases peptide N-glycosidase F (PNGase F) et endoglycosidase H (EndoH) proviennent de chez Roche Diagnostics, (Laval, Québec, Canada). Les ADN polymérase *Vent* de New England BioLabs (Pickering, Ontario, Canada) et *Phusion® Hot Start High-Fidelity* de Finnzymes (Woburn, Massachusetts, USA) ont été utilisées pour la biologie moléculaire. L'ensemble de purification d'ADN *QIAquick PCR purification kit* provient de chez Qiagen Inc. (Mississauga, Ontario, Canada). L'ensemble de réactifs de Bradford (Bio-Rad D_C Protein Assay) provient de chez Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). Les acides amines radiomarqués [³⁵S]cystéine et [³⁵S]méthionine et l'amplificateur d'autoradiographie (*autoradiography enhancer*) EN³HANCE proviennent de chez PerkinElmer (Boston, MA, USA). Les billes de sépharose pré-couplées à la protéine G ont été achetées chez Amersham Pharmacia (Piscataway, NJ, USA). Les films d'imagerie scientifique Kodak® X-Omat™ Blue XB-1 et Biomax™ MR de chez Eastman Kodak Company (Rochester, NY, USA) ont été respectivement utilisés pour révéler les immunobuvardage de type Western et les autoradiographies (marquage métabolique + chasse). La coelenterazine H provient de chez Nanolight Technologies, Prolume Ltd. (Pinetop, AZ, USA). La poly-D-lysine provient de chez Sigma-Aldrich Canada (Oakville, Ontario, Canada). L'agent transfectant utilisé est la Lipofectamine 2000 de chez Invitrogen Corporation (Carlsbad, California). Les réactifs *Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus* (le réactif oxydant et le réactif *enhanced luminol*) de chez PerkinElmer Life Sciences, Inc. (Boston, MA, USA) et *SuperSignal ELISA femto maximum Sensitivity Substrate* de chez Thermo Fisher Scientific (Nepean, Ontario, Canada) ont été utilisés pour révéler les immunobuvardages de type Western. Les

composés **AT3163** [112], **AT3186** [113] et **AT3228** [115] ont été fournis par Amicus Therapeutics (sous forme lyophilisée) et ont été resuspendus à une concentration de 10mM dans du DMSO 100%. Le composé **SR121463** provient de chez Sanofi-Synthélabo Recherche (France) et été dissout à une concentration de 10mM dans de l'eau pure contenant 10% de DMSO.

2.2 Méthodes

2.2.1 Constructions d'ADN

CNX-Venus - La construction calnexine-Venus (CNX-Venus) a été générée en sous-clonant la séquence codante de la calnexine humaine achetée chez Origene (Rockville, MD, USA) en 5' de la séquence codant pour la protéine fluorescente Venus dans le vecteur pcDNA3.1-Venus [116], en supprimant le codon STOP de la calnexine et en laissant un polypeptide de liaison (linker) de 8 acides aminés (AEVGARIH) entre les 2 protéines. L'étiquette Venus a été placée en C-terminal pour 2 raisons : pour être dans le même compartiment (cytosol) que le donneur et pour ne pas interférer avec l'activité de la CNX. Nous avons procédé en amplifiant la calnexine par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en utilisant les oligonucléotides sens 5'-CGCCATGCTAGCACGATATCGCCACCATGGAAGGG AAGTG-3' et anti-sens 5'-GTTCTGACCGGTAATGGATCCTTGCTCCACCTCCGCCCTCTCTTCGTGGCTTTC-3'. Le fragment ainsi amplifié grâce à l'ADN polymérase Phusion et le vecteur d'accueil ont été digérés avec les enzymes de restriction NheI et AgeI avant d'être ligués ensemble. Le résultat final du sous-clonage a été vérifié par séquençage bidirectionnel.

3HA-MC4R - Les trois formes mutantes du MC4R humain (hMC4R), soit les mutations S58C, R165W et P299H, ont été générées par PCR à partir de la matrice de l'ADNc 3HA-hMC4R(WT), qui a été procuré chez Missouri S&T cDNA Resource Center (www.cdna.org). Chaque mutation ponctuelle a été insérée par PCR grâce à l'ADN polymérase taq Phusion en utilisant des oligonucléotides spécifiques (listés ci-dessous) contenant la mutation complémentaire aux brins opposés de la matrice hMC4R(WT) et soit un oligonucléotide T7 sens (5'-ATTAATACGACTCACTATAGGG-3') ou un oligonucléotide pcDNA3.1 anti-sens (5'-AGAACGTGGACTCCAACGTCAAAG-3').
S58C sens : 5'-CTCTGGGTGTCATCTGCTTGGAGAATATC-3'

R165W sens : 5'-GACAGTTAAGTGGGTTGGGATCATC-3'

P299H sens : 5'-GTGTAATTCAATCATCGATCATCTGATTTATGCACTCCGGAG-3'

Les fragments 5' et 3' comportant la mutation générés séparément dans la première PCR ont été utilisés ensemble dans une seconde PCR en utilisant un oligonucléotide sens s'hybridant au promoteur T7 sens 5'-ATTAATACGACTCACTATAGGG-3') ou un oligonucléotide s'hybridant au vecteur pcDNA3.1 anti-sens (5'-AGAACGTGGACTCCAACGTCAAAG-3') afin de générer la séquence codante complète. Les produits de PCR ont été purifiés avec l'ensemble de purification d'ADN « PCR purification » de Qiagen et insérés dans un vecteur pcDNA3.1(+) suite à une digestion avec les enzymes KpnI et XhoI.

3HA-MC4R-Venus - Le hMC4R(WT) doublement étiqueté avec le 3HA en N-terminal et la Venus en C-terminal a été généré par PCR en prenant comme matrice le 3HA-MC4R et en utilisant un oligonucléotide 3HA-MC4R sens contenant le codon de départ ATG et le site de restriction BamHI en amont et un oligonucléotide MC4R anti-sens contenant la fin de la séquence codante du hMC4R sans le codon stop, un lien peptidique flexible (VGGGGS) et un site de restriction AgeI en aval (voir séquences ici-bas).

3HA-MC4R sens :

5'-TCGGATCCCGAGATCTCACCATGTACCCATACGATGTTC-3'

3HA-MC4R anti-sens :

5'-GAGTTGTCTAGCAGGATAGTAGGCGGAGGTGGGAGCAAGCTTGTACCGGTC-3'

Le produit de PCR a été purifié et inséré dans le vecteur pcDNA3.1(+)-Venus suite à une digestion par les enzymes de restriction BamHI et AgeI. L'étiquette Venus a été ajoutée aux constructions 3HA-hMC4R mutantes en sous-clonant la séquence codante pour le C-terminal du hMC4R, le lien peptidique flexible et la Venus provenant de la construction 3HA-hMC4R(WT)-Venus, par une digestion avec les enzymes de restriction BspEI (en aval du codon du P299) et XbaI (en aval de la Venus).

3HA-MC4R-Luc - Le 3HA-MC4R(WT)-luc a été généré par PCR en utilisant un oligonucléotide 3HA-MC4R sens contenant le codon de départ ATG et le site de restriction BglII en amont et un oligonucléotide MC4R anti-sens contenant la fin de la séquence codante du hMC4R sans le codon stop, un lien peptidique flexible (VGGGGS) et un site de

restriction HindIII en aval (voir séquences ici-bas). Le produit de PCR a été purifié et inséré dans le vecteur phRLuc-N3 suite à une digestion par les enzymes de restriction BglII et HindIII.

3HA-MC4R sens :

5'-TCGGATCCCCGAGATCTCACCATGTACCCATACGATGTTC-3'

3HA-MC4R anti-sens :

5'-GAGTTGTCTAGCAGGATAGTAGGCGGAGGTGGGAGCAAAGCTTGTACCGGTC-3'

Les mutants 3HA-MC4R(S58C)-Luc, 3HA-MC4R(R165W)-Luc et 3HA-MC4R(P299H)-Luc ont été générés en substituant la séquence Venus des vecteurs 3HA-MC4R(mutant)-Venus par la séquence de la luciférase, soit par l'insertion de la partie C-terminale de la matrice 3HA-MC4R(WT)-Luc (comprenant le C-ter du MC4R, le lien peptidique et la luciférase complète) dans les vecteurs 3HA-MC4R(mutant)-Venus, suite à une digestion avec les enzymes de restriction BspEI et EcoRI.

3HA-V2R - L'ADNc du 3HA-hV2R(WT) dans le vecteur pcDNA3.1(+) a été acheté chez Missouri S&T cDNA Resource Center (www.cdna.org). La version mutée 3HA-hV2R(W164S) a été générée par PCR à partir de la matrice 3HA-hV2R(WT) selon le protocole *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* de Stratagene (La Jolla, CA, USA). Les deux oligonucléotides complémentaires contenant la mutation désirée (sens: 5'-CCGGCCGGTGCTAGTGGCTTCGGCCTTCTCGCTCCTTCTCA-3' ; anti-sens: 3'-TGAGAAGGAGCGAGAAGGCCGAAGCCACTAGCACCGGCCGG-5') ont été utilisés pour la PCR en présence d'ADN polymérase *Vent*.

V2R-Luc - La construction V2R(WT)-Luc a été générée en sous-clonant la séquence codante de la Luc en 3' de celle du V2R dans le vecteur pcDNA3.1-V2R, en laissant un lien peptidique de 6 acides aminés (GSGTGS) entre le C-terminal du V2R et la méthionine initiatrice de la Luc [103].

3HA-V2R-Luc - Le 3HA-V2R(WT)-Luc a été généré par PCR en utilisant comme matrice le 3HA-V2R et les oligonucléotides 3HA-V2R sens contenant le codon de départ ATG et le site de restriction AflII en amont (5'-cccgggcttaagaccaccatgTACCCATACGATGTTCCAGATTACG-3') et V2R anti-sens contenant la fin de la séquence codante du hV2R sans le codon stop, un lien peptidique flexible (GSGTGS) et un site de restriction BamHI en aval

(5'-ccccGGATCCGGTACCGGAGCCcgatgaagtgtccttgccaggag-3'). Le produit de PCR a été purifié et inséré dans le vecteur V2R-Luc suite à une digestion par les enzymes de restriction AflIII et BamHI. Le 3HA-V2R(W164S)-Luc a été généré selon la même procédure et avec les mêmes oligonucléotides, en utilisant cette fois le 3HA-V2R(W164S) comme matrice pour la PCR.

2.2.2 Culture cellulaire

Les cellules embryonnaires de rein humain HEK293T ont été cultivées dans du DMEM 10%FBS contenant 100 UI/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 2 mM L-glutamine à une température de 37°C en présence de 5% de CO₂ et à saturation d'eau dans l'air.

Transfections – Des plasmides d'expression mammalienne codant l'ADNc des différentes protéines de fusion mentionnées ont été transfectées dans les cellules HEK293T, à moins d'indication contraire, en utilisant l'agent transfectant lipofectamine 2000 à un ratio de 2,5 µL par 1 µg d'ADN, et en diluant l'ADN dans de l'OptiMEM.

Génération de cellules exprimant de manière stable le 3HA-MC4R(WT), le 3HA-MC4R(S58C), le 3HA-MC4R(R165W) ou le 3HA-MC4R(P299H) – Des cellules HEK293T ont été transfectées avec soit la construction 3HA-MC4R(WT), 3HA-MC4R(S58C), 3HA-MC4R(R165W) ou 3HA-MC4R(P299H). La sélection des cellules exprimant les plasmides transfectés a été amorcée 48 h après la transfection, en changeant le milieu de culture pour du milieu contenant 600 µg/mL de généticine (G418). Rappelons que le vecteur pcDNA3.1(+) est le vecteur de base de chaque construction, et qu'il contient un gène de résistance à la généticine (néomycine) : seules les cellules exprimant le plasmide pourront survivre. Une fois la mort cellulaire amorcée, les cellules attachées ont été rincées et remise à incuber avec du nouveau milieu contenant le G418. Les cellules ont été trypsinisées et diluées pour faire des colonies distinctes. Une fois les colonies visibles à l'œil nu, elles ont été piquées à l'aide d'une pipette P1000 (le clone isolé a été bien délimité avec un crayon sous le pétri, gratté avec l'embout de la pipette et aspiré). Les cellules recueillies d'un clone ont été redistribuées dans un puits d'une plaque à 96 puits. Les lignées monoclonales ainsi générées ont été confirmées par cytométrie de flux. Les clones sélectionnés pour les expériences mentionnées avaient une expression similaire

les un les autres et avaient une expression faible, relativement à la cytométrie de flux, afin de ne pas surengorger le RE et ainsi éviter les problèmes éventuels reliés à la surexpression, comme le *unfolded protein response* (UPR).

Génération de cellules exprimant de manière stable le 3HA-V2R(WT) ou le 3HA-V2R(W164S) – Des cellules HEK293T ont été transfectées avec les constructions 3HA-V2R(WT) ou 3HA-V2R(W164S). La sélection des cellules exprimant les plasmides transfectés a ensuite été amorcée 48 h après la transfection, en changeant le milieu de culture pour du milieu contenant 600 µg/mL de généticine (G418). Après 2 semaines de sélection au G418, les lignées polyclonales ont été confirmées par immunobuvardage de type Western.

2.2.3 Essais

Essai d'accumulation de l'AMPc – Des cellules HEK293T ont été transfectées de manière transitoire avec chaque construction doublement étiquetée, soit les constructions 3HA-MC4R(WT)-Venus, 3HA-MC4R(S58C)-Venus, 3HA-MC4R(R165W)-Venus et 3HA-MC4R(P299H)-Venus. Trente-six heures après la transfection, les cellules ont été traitées ou non pendant 12h avec les composés **AT3163**, **AT3186** et **AT3228** à une concentration finale de 10µM. Quarante-huit heures après la transfection, les cellules ont été récoltées et lavées avant de procéder à l'essai dans du PBS pH 7.4 contenant 0,1% de glucose (tampon AMPc). Les cellules ont ensuite été distribuées à raison de 30 000 cellules par puits dans des plaques à 96 puits, dans du tampon AMPc contenant 0,75 mM d'IBMX. L'accumulation d'AMPc a été mesurée après 15 min de stimulation avec 100 nM de l'agoniste NDP-α-MSH à 37°C, sur des cellules prétraitées ou non avec les composés **AT3163**, **AT3186** et **AT3228**. La mesure de l'accumulation d'AMPc a été réalisée sur 10 000 cellules/puits dans une plaque à 384 puits grâce à l'utilisation de l'ensemble *HTRF cAMP dynamic 2 kit* de Cis-Bio (Bedford, MA, USA). Les cellules ont été lysées et mises en présence du compétiteur AMPc-d2 (fluorophore : Ex=620 nm, Em=665 nm) et de l'anticorps anti-AMPc traceur couplé au Cryptate (fluorophore : Ex=337 nm, Em=620 nm). Le *HTRF cAMP dynamic 2 kit* est un immunoessai compétitif entre la production d'AMPc produite par la cellule et l'AMPc marquée avec le colorant d2. La liaison du traceur a été visualisée par un anticorps anti-AMPc étiqueté avec le Cryptate. La lecture du signal HTRF a été exécutée sur le lecteur de plaque TR-FRET Artemis provenant de Cosmo Bio

Co. (Carlsbad, CA, USA). Le principe du TR-FRET est le transfert d'énergie combiné à la fluorescence en temps résolu.

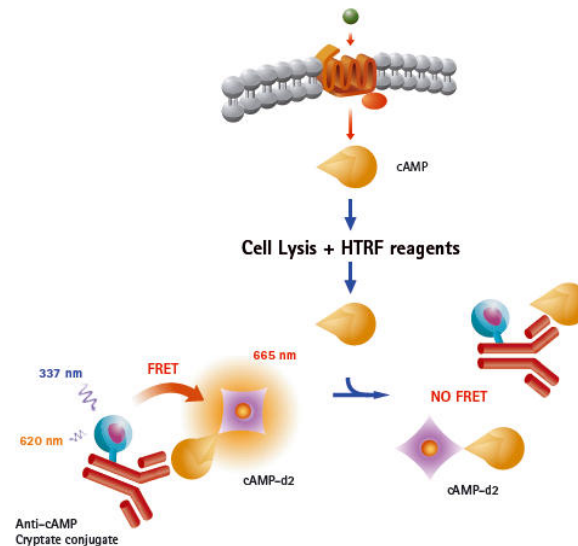


Figure 2.1. Principe de l'essai HTRF cAMP dynamic 2 kit de Cis-Bio. En bleu et mauve : le fluorophore Cryptate. En mauve et orange : le fluorophore d2.

Cytométrie de flux – Des cellules HEK293T ont été mis en croissance dans des pétris de 100mm et transfectées de manière transitoire pour **a) l'essai de rétablissement à la surface cellulaire du MC4R**, avec les protéines de fusion 3HA-MC4R(WT)-Venus, 3HA-MC4R(S58C)-Venus, 3HA-MC4R(R165W)-Venus ou 3HA-MC4R(P299H)-Venus, selon un ratio de 3 μ L de transfectant « Fugene 6 » pour 1 μ g d'ADN, ou pour **b) l'essai d'efficacité de rétablissement à la surface cellulaire du V2R avec le SR121463** (figure 7.2, annexe), soit avec les constructions 3HA-V2R(WT)-Luc ou 3HA-V2R(W164S)-Luc, selon un ratio de 2,5 μ L de transfectant « Lipofectamine 2000 » pour 1 μ g d'ADN. Les cellules ont été maintenues dans du DMEM complet-10% FBS pour 24 h et ensuite redistribuées dans des pétris 60 mm avant le traitement. Ces cellules ont été incubées ou non avec les chaperones pharmacologiques (**a) AT3163, AT3186 ou AT3228, b) SR121463**) à une concentration de 10 μ M dans du DMEM complet-10% FBS 12 h avant l'essai de cytométrie de flux. Quarante-huit heures après la transfection, les cellules ont été récoltées, rincées dans du PBS-Dubelcco 1X et transférées dans 300 μ L de tampon Tyrode [140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 12 mM NaHCO₃, 5,6 mM D-Glucose, 0,49 mM MgCl₂, 0,37 mM NaHPO₄, 25 mM Hepes pH7,4] contenant 1% de BSA et de l'anticorps anti-HA monoclonal de souris (HA.11, Covance, Berkeley, Californie) à une

dilution de (1:1000). Dans cette condition, l'anticorps primaire s'hybride seulement aux récepteurs exprimés à la surface cellulaire. Après un lavage, les cellules ont été incubées dans 300 µL de tampon Tyrode contenant 1% de BSA et de l'anticorps anti-souris pré-couplé au fluorophore Alexa647 à une dilution de (1:1000). Les cellules ont été lavées et resuspendues dans 500 µL de PBS. Les échantillons ont été passés dans l'appareil a) système BD LSR II ou b) Canto (BD HTS Option For FACSCanto™ II) de Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ, USA). L'expression relative à la surface cellulaire a été calculée en faisant le ratio du signal à la surface (Alexa647) sur le signal total (Venus) pour l'ensemble des cellules exprimant la Venus, pour être ensuite exprimé en pourcentage du WT non traité.

Immunoprécipitation d'extraits totaux – Des cellules en croissance dans des pétris de 100 mm ont été mis soit en présence de 10 µM de chaperone pharmacologique (**AT3163**, **AT3186** ou **AT3228**) ou de 0,1% DMSO (situation contrôle) pendant 16 h. Les cellules ont ensuite été recueillies mécaniquement dans du PBS et lysées 15 min à 4°C dans un tampon (RIPA modifié) contenant 50 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% déoxycholate, 5 µg/mL leupeptine, 5 µg/mL inhibiteur de trypsine de la fève de soja (STI) et 10 µg/mL benzamidine (tampon de lyse). Les lysats ont été centrifugés 30 min à 4°C à 18000 x g (13000 rpm, rotor Eppendorf F45-30-11), après quoi les surnageants ont été récupérés et dosés à l'aide des réactifs de Bradford compatibles avec la présence de détergents de chez Bio-Rad Laboratories. L'immunoprécipitation a ensuite été lancée sur 500 µg de protéines d'extrait total de chacune des conditions par l'ajout d'un anticorps monoclonal anti-HA de souris (clone 16B12, HA.11 de Covance) (1 µg d'anticorps pour 250 µg protéines) et de 30 µL de suspension de billes de protéine G-sépharose par mg de protéine (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl) pour la nuit à 4°C avec agitation. Les complexes protéines G-sépharose/anticorps/antigène ont été isolés par centrifugation à 6000 x g (7500 rpm, rotor Eppendorf F45-30-11) pendant 2 min, le surnageant a été aspiré et le culot de billes a été lavé trois fois avec le tampon de lyse et une fois avec du tampon 50 mM HEPES pH7,4. Après le dernier lavage, le culot de billes a été resuspendu dans 60 µL de tampon de chargement 2X contenant 125 mM Tris-HCl pH6,8, 4,1% (m/v) SDS, 20% (v/v) glycérol, 284 mM β-mercaptoéthanol, 0,01 mg/mL de bleu de bromophénol et chauffé 30 min à 42°C pour l'élution des protéines. Les échantillons ont ensuite été fractionnés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) et révélés par immunobuvardage de type Western.

Immunoprécipitation des récepteurs présents à la surface cellulaire (IP de surface) –

Des cellules en croissance dans des pétris de 100 mm ont été mis soit en présence de 10 μ M de chaperone pharmacologique (**AT3163**, **AT3186** ou **AT3228**) ou de 0,1% DMSO (situation contrôle) pendant 16 h. Les cellules ont ensuite été recueillies mécaniquement dans du PBS, culotées en centrifugeant 2 min à 40 x g (600 rpm, rotor Eppendorf F45-30-11), resuspendues dans du PBS-0,2% BSA (tampon de blocage) et incubées 1 h à 4°C avec agitation. Les cellules entières ont ensuite été incubées avec l'anticorps monoclonal anti-HA de souris (clone 16B12, HA.11 de Covance) à une dilution de 1:1000 dans le tampon de blocage à 4°C avec agitation pendant 2 h. Afin d'éliminer les anticorps non hybridés libres en solution, les cellules ont été lavées deux fois avec le tampon de blocage et une fois avec du PBS. Les cellules ont ensuite été lysées 15 min à 4°C dans le même tampon de lyse (RIPA modifié) mentionné précédemment et le lysat a été centrifugé 30 min à 4°C à 18000 x g. L'immunoprécipitation a été achevée en ajoutant 80 μ L de suspension de billes de protéine G-sépharose au surnageant et placée sous agitation à 4°C pendant 16 h. Le lendemain, le surnageant a été recueilli après 2 min de centrifugation à 6000 x g, et réservé à 4°C. Les billes ont été lavées 3 fois avec le tampon de lyse, 1 fois avec le tampon HEPES 50 mM pH7,4 et les protéines ont été éluées des billes en chauffant les échantillons à 42°C après l'ajout de 60 μ L de tampon d'élution/de chargement mentionné précédemment. Toutes les solutions ont été utilisées froides (4°C). Les échantillons ont été fractionnés sur des gels SDS-PAGE 10% suite à une correction de la quantité de matériel à déposer sur gel (voir contrôle de l'IP de surface), transférés sur une membrane de PVDF et immunobuvarés selon la procédure décrite ci-bas. Les protéines étiquetées 3HA ont été révélées avec les réactifs *SuperSignal ELISA femto maximum Sensitivity Substrate*.

Contrôle de l'IP de surface : immunoprécipitation du surnageant (IP du surnageant)

– Pour avoir une idée de la quantité de récepteur total dans les différents échantillons et ainsi contrôler la quantité de matériel d'IP de surface à déposer sur gel, une IP des récepteurs intracellulaires n'ayant pas été immunoprécipités lors de l'IP de surface (dû à leur absence à la surface cellulaire) a été exécutée. Pour ce faire, 80 μ L de suspension de billes de protéine G-sépharose et de l'anticorps anti-HA utilisé précédemment (dilution de 1:200) ont été ajoutés aux surnageants mis en réserve suite à l'IP de surface et les placés à 4°C avec agitation pendant 16 h. Les échantillons ont ensuite été lavés et élués tel que décrit précédemment. Une même quantité d'échantillon a été déposée sur gel SDS-PAGE. La quantité de récepteur dans chaque puits a ensuite été dosée avec le logiciel d'analyse

de densitométrie Quantity One de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) sur les immunobuvardages de type Western obtenus subséquemment. Selon le résultat, les échantillons de chaque construction (WT, S58C R165 et P299H) ont été refractionnés en ajustant la quantité de matériel mis sur gel afin d'obtenir une quantité similaire de récepteur de construction en construction. Les échantillons de l'IP de surface ont ensuite été fractionnés sur gel en suivant les mêmes proportions que pour l'IP du surnageant, afin d'obtenir une IP de surface qui soit semi-quantitative. Les protéines étiquetées 3HA ont été révélées avec les réactifs *Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus*.

Digestion avec des endoglycosidases – Des cellules mis en croissance dans des pétris de 150mm ont été mis soit en présence de 10 μ M de chaperone pharmacologique (AT3163, AT3186 ou AT3228 pour le MC4R et SR121463 pour le V2R) ou non (DMEM à 0,1% DMSO pour le MC4R et DMEM seul pour le V2R) pendant 16 h. Une IP de surface telle que décrite a été effectuée. Les récepteurs immunoprécipités ont été élués dans 20 μ L de tampon d'élution contenant 1% de SDS et 50 mM de phosphate de sodium pH7,5, en chauffant 15 min à 42°C. Pour chaque condition, l'échantillon a été séparé en 3 (6 μ L chaque) : un contrôle sans enzyme, une digestion avec l'endoglycosidase H (EndoH) et une digestion avec la N-glycosidase F (PNGase F). Deux portions ont été incubées dans du tampon EndoH (50 mM Phosphate de sodium pH5,5, 0,5% de DDM, 50 mM d'EDTA, 1% de β -mercaptoéthanol, 0,2 mM de PMSF, 5 μ g/mL leupeptine, 5 μ g/mL inhibiteur de trypsine de la fève de soja (STI) et 10 μ g/mL benzamidine); l'une sans enzyme (le contrôle), et l'autre avec 39 mU/mL d'EndoH. La dernière portion a été incubée dans du tampon PNGase F (même composition que tampon EndoH, mais phosphate de sodium à pH7,5), en présence de 21,9 U/mL PNGase F. Le tout a été incubé 16 h à 37°C et les enzymes ont été inactivées par l'ajout de tampon (SDS-gel) dénaturant. Les échantillons ont été fractionnés par SDS-PAGE 10% et révélés par immunobuvardage de type Western.

Immunobuvardage de type Western – Les échantillons de protéines ont été fractionnés par SDS-PAGE (10% acrylamide) et transférés sur une membrane PVDF (0,45 μ m Immobilon-P de Millipore). Les membranes ont été bloquées dans du TBS-0,2%T contenant 3% de BSA (tampon de blocage) pour ensuite être soumises à l'immunobuvardage en utilisant de l'anticorps primaire anti-HA pré-couplé à la peroxydase de raifort (clone 3F10-HRP, 2013819, Roche Diagnostics (Indianapolis, ID)) dilué à 1:10000 dans le tampon de blocage. Les membranes ont été lavées trois fois avec du

TBS-0,2%T et une fois avec une TBS avant de révéler la présence de notre protéine d'intérêt à l'aide du luminol *Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus* ou *SuperSignal ELISA femto maximum Sensitivity Substrate* et de films d'imagerie scientifique Kodak® X-Omat™ Blue XB-1.

BRET – Des cellules HEK293T exprimant de manière transitoire une quantité fixe des constructions 3HA-MC4R(WT)-Luc, 3HA-MC4R(S58C)-Luc, 3HA-MC4R(R165W)-Luc, 3HA-MC4R(P299H)-Luc, V2R(WT)-Luc ou V2R(W164S)-Luc (transfectant pour le V2R : polyéthylène imine ou PEI) conjointement à une quantité croissante de la construction CNX-Venus ont été distribuées dans des plaques à 96 puits blanches à fond opaque CulturPlate™-96 et à fond transparent Costar® prétraitées à la poly(D-lysine hydrobromure), à raison de 100 000 cellules par puits, 24 h après la transfection. Une fois les cellules attachées, le traitement ou non avec 10 µM de chaperone pharmacologique (AT3163, AT3186 ou AT3228 pour le MC4R et SR121463 pour le V2R) a été effectué. Seize heures après le traitement et/ou 48 h suivant la transfection, les cellules ont été rincées une fois et recouvertes de 90 µL de PBS. Les lectures de fluorescence ont été recueillies avec le lecteur de plaques FlexStation II de MDS Analytical Technologies (Sunnyvale, CA, USA) avant d'incuber les cellules 10 min dans 5 µM de coelenterazine H pour mesurer le BRET₁ avec le lecteur Mithras LB940 de Berthold Technologies GmbH & Co. KG (Bad Wildbad, Allemagne). Les valeurs de luminescence ont été celles recueillies par le lecteur de BRET. Le signal de BRET a été déterminé en calculant le ratio de fluorescence émise par la CNX-Venus (510-550 nm) sur la luminescence émise par le récepteur-Luc (460-500 nm). Les valeurs ont été corrigées en soustrayant le signal de base obtenu lorsque le récepteur-Luc a été exprimé seul, et donne ainsi le BRETnet. Les signaux de BRETnet ont été mis en graphe en fonction de la quantité de fluorescence exprimée avec le logiciel GraphPad Prism (San Diego, CA, USA). Les courbes ont été dessinées selon l'équation du *one phase exponential association*. Les pics d'émission de la luciférase et de la Venus sont respectivement environ 480 nm et 530 nm.

Marquage métabolique suivi de chasses (pulse chase) – Des cellules HEK293T exprimant de manière stable les protéines de fusion 3HA-MC4R(WT), 3HA-MC4R(S58C), 3HA-MC4R(R165W) ou 3HA-MC4R(P299H) ainsi que des cellules HEK293T (BCM3) ont étéensemencées dans des pétris de 150 mm et incubées à 37°C en présence de 5% de CO₂ et en saturation de l'air en eau. Toutes les incubations de cellules pour cette expérience ont été réalisées dans ces conditions. Le lendemain, les cellules ont été

incubées dans du DMEM sans méthionine et sans cystéine supplémenté de 0,8 mM de glutamine pendant 60 min (jeûne). Les cellules ont ensuite été exposées à du DMEM contenant 1,2 mCi de [³⁵S]-méthionine et [³⁵S]-cystéine par pètri (150 µCi/mL) pendant 90 min (marquage). Après ce temps de marquage, le milieu radioactif a été retiré, les cellules ont été rincées une fois avec la solution de chasse (DMEM supplémenté de 5 mM de méthionine et de 5 mM de cystéine non radiomarquées) et incubées pour 0; 30 min; 1 h; 2 h; 4 h; 6 h; 8 h ou 22 h (chasse) avant d'être récoltées. Les cellules HEK293T ont un temps de chasse de 0 min. Les cellules ont ensuite été lysées 30 min dans du tampon B (25 mM de Tris pH7,4, 140 mM de NaCl, 2 mM d'EDTA, 5 µg/mL de leupeptine, 5 µg/mL d'inhibiteur de trypsine de la fève de soya et 10 µg/mL de benzamidine) contenant 0,5% de digitonine (tampon B-0,5% digitonine). Les différentes protéines de fusion ont été immunoprécipitées en présence de l'anticorps monoclonal de souris anti-HA (clone 16B12, HA.11 de Covance) et des billes de protéine G-sépharose à 4°C, avec agitation, pour la nuit. Les billes ont ensuite été lavées 1 fois avec du tampon B-0,5% digitonine, 3 fois avec du tampon B-0,1% digitonine et 1 fois avec du Tris 25 mM pH7,4 avant d'éluer les protéines immunoprécipitées avec du tampon d'élution à pH7,4 contenant du Tris 25mM et 1% de SDS en incubant le tout 15 min à 25°C, suivi de 15 min à 42°C. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 6000 x g pendant 1 min et les surnageants ont été transférés sur une deuxième série de billes d'agarose pré-couplées à un anticorps anti-HA (clone 3F10). Du tampon B-0,5% digitonine (620 µL) a été ajouté aux billes de la 1^{ère} IP pour les rincer, et le surnageant obtenu après centrifugation a été ajouté à la deuxième série de billes. Les échantillons ont été mis à 4°C pour la nuit. Cette 2^e IP a pour but d'éliminer le plus de bruit de fond possible associé la radioactivité. Le lendemain, les billes ont été lavées de la même manière qu'à la 1^{ère} IP, avec comme seule différence un pH de 6,8 au lieu de 7,4 pour le dernier tampon de lavage. Du tampon (2X) Laemmli contenant 2 M d'urée et 100 mM de DTT a été ajouté aux billes et chauffé 15 min à 42°C pour éluer les protéines immunoprécipitées. Les échantillons ont été fractionnés par SDS-PAGE 10% et les gels ont été traités avec le *EN³HANCE Autoradiography enhancer* avant d'être exposés sur des films BiomaxTM MR pendant un nombre variable de jours. La demi-vie de la forme immature du récepteur a été évaluée à l'aide du logiciel d'analyse de densitométrie *Quantity One* de BioRad .

Afin de vérifier que la difficulté à réussir cet essai n'était pas dû au protocole, l'expérience a aussi été tentée avec le 3HA-V2R(WT) avec les mêmes conditions, l'exception du temps

de marquage (30 min) et des temps de chasse (0 min et 2 h), qui ont été ajustées en fonction de la cinétique de maturation rapide du V2R.

2.2.4 Statistiques

Statistiques BRET – À la figure 3.6, une analyse non linéaire multiple a été exécutée en utilisant une stratégie de *bootstrap* pour déterminer si les valeurs de BRETmax obtenues pour chaque courbe sont significativement différentes les unes des autres. Des régressions non linéaires ont été générées en utilisant l'équation 1, où les paramètres de BRETmax ont été optimisés en utilisant la méthode Levenberg-Marquardt [117] suivant l'implémentation proposée par Press *et al.* [118]. En utilisant le test d'échantillonnage multiple avec remplacement [119], 100 000 répétitions *bootstrap* de cette procédure ont été exécutées. Les courbes générées correspondent à l'ajustement (*fit*) optimal obtenu à partir des données. Les zones grises représentent les percentiles 0,025 à 0,975 de 10 000 courbes, calculées pour chaque donnée Venus. La significativité de la différence des BRETmax a été quantifiée par les valeurs *p* (*p values*) qui sont déterminées par un test unilatéral par ré-échantillonnage (*one-sided resampling-based test*) exécuté sur 100 000 répétitions. Les valeurs *p* obtenues par cette méthode représentent la proportion des valeurs BRETmax obtenus par ré-échantillonnages pour lesquels il n'y a pas de différence entre les conditions contrôles et expérimentales. De faibles valeurs *p* indiquent donc une forte probabilité statistique que la différence ne soient pas due au hasard. Le seuil de $p < 0,01$ a été choisi comme limite pour accepter qu'une différence est statistiquement significative.

Équation 1 :

$$Y = Y_{\max} * (1.0 - e^{(-k * x)})$$

Où *x* est la fluorescence totale Venus.

À la figure 3.1, les données représentent la moyenne \pm l'erreur standard sur la moyenne (SEM) calculées à partir de 3 expériences indépendantes. La significativité statistique de la différence a été évaluée par une analyse de variance à une seule variable (*one-way ANOVA*) suivi d'un test post-hoc de Boniferroni à comparaisons multiples. Les analyses ont été faites à l'aide du logiciel GraphPad Prism 4.0c (San Diego, CA, USA).

3. RÉSULTATS

Compte tenu du fait que la notion de chaperone pharmacologique sur le V2R a pu être appliquée à différents RCPG (δ OR [107], GnRHR [108, 109], rhodopsine [110] et CaSR [111]), nous avons émis l'hypothèse que des ligands spécifiques au MC4R pourraient aussi agir à titre de chaperone pharmacologique sur le MC4R.

Trois composés lipophiles (perméables à la membrane) spécifiques au MC4R ont été sélectionnés pour la présente étude (tableau IV). Deux ligands de propriété antagoniste de différente affinité pour le MC4R(WT) ont été choisis pour déterminer si cette différence d'affinité engendre une réponse distincte. Un ligand agoniste a aussi été sélectionné afin de voir si les différentes propriétés de signalisation ont le même effet ou pas sur le rétablissement de l'expression à la surface cellulaire et de la fonctionnalité. Il est important de souligner que ces affinités ont été mesurées pour le MC4R de type sauvage seulement (WT). Quoique les mutants sélectionnés soient aptes à lier le ligand NDP- α -MSH, les affinités de ces composés pour les mutants peuvent varier à la hausse ou à la baisse selon l'effet de la mutation sur la cavité de liaison. Au cours de l'analyse, nous référerons aux chaperones pharmacologiques selon leur propriété de ligand par l'appellation de « CP antagoniste » ou « CP agoniste ».

Parmi les mutations du MC4R menant à la rétention intracellulaire, les mutants S58C, R165W et P299H ont été sélectionnés. Les mutants S58C et R165W ont été choisis en fonction de leur faible expression à la surface cellulaire (<50% de la population totale) pour favoriser la détection d'une augmentation de l'expression à la membrane plasmique suite au traitement avec les composés. Le choix de plus d'un récepteur mutant permet d'assurer que l'effet observé ne soit pas unique à une seule mutation. Le mutant P299H a été sélectionné à titre de contrôle négatif sur la fonctionnalité du récepteur, étant donné que la mutation est située dans le motif de liaison à la protéine G (N/DP299XXY).

Les différents composés ont donc été testés sur le MC4R(WT) et les trois mutants énoncés. Nous supposons une action de chaperone pharmacologique de ces ligands lipophiles et spécifiques au MC4R sur les mutants de ce récepteur.

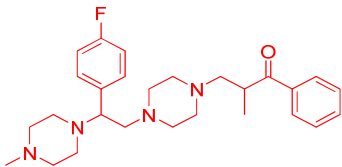
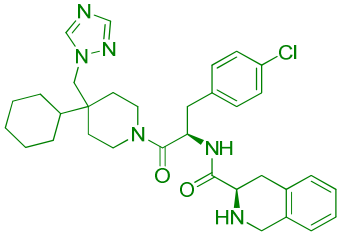

Structure	code	K _i (nM)	IC ₅₀ (nM)	Compagnie	Réf.
	AT3163	691	719	Amgen	[112]
	AT3186	5,6	1,2	Merck	[113, 120]
	AT3228	23,7	25	Neurocrine Biosciences	[115]

Tableau IV. La structure des composés lipophiles spécifiques au MC4R et leur affinité au MC4R(WT).

3.1 Identification de chaperones pharmacologiques

Tel que mentionné dans l'introduction, les composés sélectionnés pour la présente étude pourront être considérées comme étant des chaperones pharmacologiques (CP) pour le récepteur s'ils réussissent à augmenter l'expression à la surface cellulaire et la fonctionnalité du récepteur mutant de manière significative. Afin de tester leur nature, ces essais ont donc été réalisés (résultats générés par Patricia René, stagiaire post-doctorale dans le laboratoire du Dr. Bouvier).

Le rétablissement de l'expression à la surface cellulaire par les différents composés spécifiques au MC4R (**AT3163**, **AT3186** et **AT3228**) a été suivi par cytométrie de flux (figure 3.1A) sur des cellules entières vivantes exprimant de manière transitoire les constructions 3HA-MC4R(WT)-Venus, 3HA-MC4R(S58C)-Venus, 3HA-MC4R(R165W)-Venus ou 3HA-MC4R(P299H)-Venus. Dans cet essai, les récepteurs présents à la surface ont été détectés par l'émission de lumière par le fluorophore Alexa647 (conjugué à un anticorps secondaire anti-souris hybridé à l'anticorps primaire anti-HA de souris), tandis que la population totale a été suivie de manière directe par la fluorescence de la protéine fluorescente Venus rattachée au MC4R. La quantité totale de récepteur a d'ailleurs été contrôlée entre les divers mutants par le niveau de fluorescence de la Venus. La proportion de récepteur à la membrane plasmique a été mesurée par le ratio Alexa647/Venus, pour être ensuite exprimée en pourcentage du WT **non traité**. L'expression relative à la surface cellulaire du MC4R(WT) **non traité** est donc arbitrairement établie à 100%. Les mutants **non traités** ont montré une expression relative à la membrane plasmique de $40,6 \pm 4,1\%$ (S58C), $19,3 \pm 7,0\%$ (R165W) et $21,6 \pm 2,4\%$ (P299H). Ces mutants, étant largement retenus à l'intérieur de la cellule, sont de bons candidats pour percevoir un gain d'expression à la surface cellulaire associée à une action de chaperone pharmacologique des composés testés.

La fonctionnalité du récepteur a été suivie par l'accumulation d'AMPc suite à une stimulation de 15 min à 37°C avec 100 nM de NDP- α -MSH, un agoniste du MC4R (figure 3.1B). Alors que l'accumulation d'AMPc stimulée par le NDP- α -MSH du MC4R(WT) est établie à 100%, les mutants non traités ne peuvent engendrer une augmentation de plus de 5% d'accumulation d'AMPc suite à la stimulation par ce ligand agoniste (ce qui est probablement statistiquement non significatif).

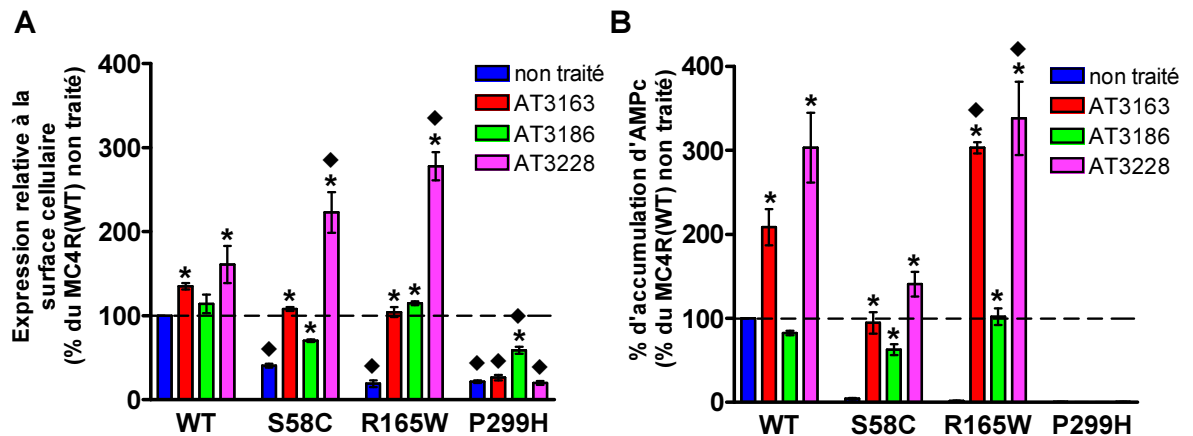


Figure 3.1. Confirmation de l'action de chaperone pharmacologique des composés spécifiques au MC4R sélectionnés. Des cellules HEK293T exprimant de manière transitoire les protéines de fusion 3HA-MC4R(WT)-Venus, 3HA-MC4R(S58C)-Venus, 3HA-MC4R(R165W)-Venus ou 3HA-MC4R(P299H)-Venus ont été incubées en absence ou présence de 10 μ M de composé spécifique au MC4R pendant **A)** 16 h ou **B)** 12 h. **A)** Les récepteurs à la surface cellulaire ont été marqués en combinant un anticorps anti-HA de souris et un anticorps anti-souris conjugué au fluorophore Alexa647. L'expression relative à la surface cellulaire est calculée en faisant le ratio Alexa647/Venus (surface/total) pour l'ensemble des cellules exprimant le récepteur. Les valeurs ont été calculées en pourcentage en prenant comme référence le WT non traité. **B)** L'accumulation d'AMPc a été mesurée avec l'essai *HTRF cAMP dynamic 2 kit* de Cis-Bio. La ligne pointillée représente en A) l'expression relative à la surface cellulaire en situation non traité du MC4R(WT) et en B) le niveau d'accumulation d'AMPc stimulé par le NDP- α -MSH en situation non traité du MC4R(WT), qui est arbitrairement établi à 100%. Non traité: DMEM 0,1%DMSO. Ces résultats représentent la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes. Les symboles représentent une différence significative issue de la comparaison entre les situations traité et non traité pour un même mutant (*, $p < 0,05$) ou de la comparaison avec le WT non traité (\blacklozenge , $p < 0,05$). Les valeurs p ont été obtenues suite à l'analyse de variance à une seule variable (one-way ANOVA) suivi d'un test post-hoc de Boniferroni à comparaisons multiples à l'aide du programme Graph-Prism 4.0c. Ces résultats ont été générés par Patricia René.

Après un traitement chronique avec les différentes CP potentielles, les tendances suivantes sont observées.

3.1.1 Le composé **AT3163**

L'antagoniste **AT3163** permet une augmentation considérable de l'expression à la surface cellulaire des mutants S58C (gain de ~70%) et R165W (gain de ~85%), pour atteindre un

niveau comparable au WT **non traité** (soit $108,1 \pm 4,0\%$ pour le S58C et $104,5 \pm 10,4\%$ pour le R165W). L'expression du P299H à la membrane plasmique n'est pas affectée par ce traitement ($26,5 \pm 5,5\%$). Il est à noter que l'expression à la surface cellulaire du MC4R(WT) est aussi augmentée de manière non négligeable, soit de l'ordre de 35% ($135,2 \pm 6,5\%$) ($p < 0,05$).

Le traitement avec l'**AT3163** permet de rétablir la fonctionnalité du S58C en faisant passer l'accumulation d'AMPC stimulée par le NDP- α -MSH de $4,3 \pm 1,7\%$ à $94,7 \pm 22,2\%$, ce qui rejoint le niveau du WT **non traité**. Dans les mêmes conditions, le R165W, malgré une expression à la surface du même niveau que le S58C, gagne ~300% d'accumulation d'AMPC stimulée par le NDP- α -MSH suite au même traitement ($303,1 \pm 11,3\%$). Le P299H ne montre aucune activité, tel que le laissait présumer l'échec du rétablissement à la surface cellulaire. Finalement, l'activité du récepteur WT est doublée ($208,5 \pm 37,2\%$) avec ce composé, malgré une hausse de l'expression à la surface cellulaire que de 35%.

3.1.2 Le composé **AT3228**

L'antagoniste **AT3228**, quant à lui, augmente l'expression du S58C à la surface cellulaire de presque 6 fois ($223,0 \pm 42,0\%$) par rapport au S58C **non traité** ($40,6 \pm 4,1\%$). Dans le cas du R165W, l'expression à la membrane plasmique passe de $19,3 \pm 7,0\%$ à $278,0 \pm 29,0\%$ suite au traitement avec ce composé. Dans les deux cas, le traitement avec l'**AT3228** fait surpasser de 2 et 3 fois, respectivement, le niveau d'expression à la surface cellulaire du WT **non traité**. Le WT aussi bénéficie d'un gain ($161,0\% \pm 38,0$), qui est du même ordre que celui obtenu avec l'**AT3163**. Aucun effet n'est observé pour le P299H, qui demeure à $20,0\% \pm 4,0$.

Le S58C traité avec l'**AT3228** montre un gain d'environ 135% d'accumulation d'AMPc sur la situation S58C **non traité** ($140,8 \pm 25,5\%$), ce qui rejoint le niveau du WT **non traité** (avec une tendance à la hausse). Ce gain est considérable, toutefois, étant donné la forte expression à la surface cellulaire ($223,0 \pm 42,0\%$), une plus forte augmentation de l'accumulation d'AMPc était attendue. Le R165W traité avec le même composé connaît une hausse de l'activation de la voie adénylate cyclase de l'ordre de 335% par rapport au R165W non traité ($338,1 \pm 75,8\%$). Cette fois, le gain en fonctionnalité est proportionnel à son expression à la surface cellulaire ($278,0 \pm 29,0\%$). Dans le cas du WT, l'accumulation d'AMPc est plus forte qu'attendu ($303,3 \pm 72,1\%$), étant donné l'expression à la surface cellulaire à $161,0\% \pm 38,0$. Le P299H n'a toujours pas d'activité ($0,53 \pm 0,18\%$), ce qui corrèle avec l'absence de gain d'expression à la membrane plasmique. Toutes ces observations mènent à conclure que malgré les fortes hausses d'expression à la surface cellulaire stimulées par l'**AT3228**, la proportion d'accumulation d'AMPc stimulée par le NDP- α -MSH suite au même traitement varie selon le mutant.

3.1.3 Le composé **AT3186**

L'agoniste **AT3186** rétablit l'expression du R165W à la membrane plasmique à un niveau similaire au WT **non traité** ($114,9 \pm 3,9\%$), soit 6 fois le niveau basal de ce mutant ($19,3 \pm 7,0\%$). Le traitement du S58C avec ce composé montre un gain d'environ 30% sur l'expression à la surface cellulaire par rapport à la situation S58C **non traité** ($70,3 \pm 2,9\%$). La tendance montre un niveau plus faible que le WT **non traité**, toutefois la différence n'est pas significative. L'expression à la surface cellulaire du P299H n'est pas rétablie au niveau du WT **non traité**, mais à la différence des traitements avec les antagonistes, elle est triplée par rapport à sa situation de base ($58,9 \pm 7,3\%$). Le WT traité avec l'**AT3186** ne montre pas d'augmentation de la proportion de récepteurs à la surface ($114 \pm 19\%$).

L'accumulation d'AMPc stimulée par le NDP- α -MSH suite au traitement avec l'**AT3186** est plus discrète que pour le composé précédent, mais reste proportionnelle à l'expression à la surface cellulaire pour le S58C ($62,9 \pm 11,3\%$) et le R165W ($102,0 \pm 17,2\%$). Le gain en fonctionnalité pour ces 2 récepteurs est considérable puisque l'activation de la voie de l'adénylate cyclase était pratiquement nulle pour ces 2 mutants **non traités** ($4,3 \pm 1,7\%$ pour le S58C et $1,8 \pm 0,7\%$, pour le R165W). Ces valeurs atteignent le niveau du WT **non traité**, avec une tendance à la baisse pour le S58C. Le P299H, malgré sa hausse

d'expression à la membrane plasmique avec ce composé, a toujours une activité nulle ($0,21 \pm 0,03\%$). Ceci peut être expliqué par l'incapacité de ce mutant de signaler par la présence de la mutation dans le site de liaison avec la protéine G qui est conservé chez les RCPG (N/DPXXY). Le WT, de son côté, montre une baisse de l'accumulation d'AMPc stimulée par le NDP- α -MSH de l'ordre de 20% par rapport à la situation **non traité** ($82,6 \pm 4,5\%$). Cette dernière observation met en lumière une potentielle désensibilisation du récepteur induite par l'action agoniste de l'**AT3186** et pourraient expliquer l'effet plus modeste de ce composé sur les mutants du MC4R ainsi que sur le récepteur de type sauvage (WT).

Un test de spécificité des composés **AT3163**, **AT3186** et **AT3228** a été exécuté en parallèle sur le V2R et a montré que les CP spécifiques au MC4R n'ont pas d'effet sur l'expression à la surface cellulaire du V2R(W164S) (figure 7.1, annexe).

De ces résultats peuvent être soulignées quelques observations intéressantes :

- 1) Bien que l'expression à la surface cellulaire soit identique entre les mutants R165W et S58C réchappés par le composé **AT3163**, l'accumulation d'AMPc pour le R165W est plus importante.
- 2) Le mutant R165W, malgré un même niveau de réchappement à la surface cellulaire avec le composé **AT3163** et le composé **AT3228**, est deux à trois fois plus efficace pour la production d'AMPc avec le composé **AT3163**.
- 3) Les 2 antagonistes induisent une potentialisation plus forte de l'activité du R165W et du WT que celle du S58C.
- 4) Le mutant S58C semble plus réfractaire aux traitements avec les antagonistes que le R165W et le WT.
- 5) L'effet observé de l'**AT3186** pourrait être amoindri par la désensibilisation potentielle des récepteurs traités, de par l'action agoniste du composé.
- 6) Le mutant P299H semble ne pas répondre aux traitements et ainsi agit comme contrôle négatif tel que prévu.

Le gain significatif de l'expression à la surface cellulaire et de la fonctionnalité des mutants S58C et R165W suite au traitement avec les composés **AT3163**, **AT3186** et **AT3228** montrent que ces composés remplissent les critères de chaperone pharmacologique (CP). Toutefois, une même CP peut avoir des effets différents selon le mutant traité, et un même mutant peut réagir différemment selon la CP utilisée.

Des affinités distinctes d'une même CP pour le MC4R(WT) et les mutants, telles que suggérées en début de section, participent fort probablement à ces effets variables. De plus, les récepteurs mutés et/ou de type sauvage, une fois liés aux CP et réchappés à la surface cellulaire, peuvent potentiellement adopter une conformation distincte de celle du WT non traité. Ces conformations distinctes peuvent aussi être différentes selon le composé utilisé, qui sont dépendantes du mode d'ancrage du composé dans la cavité de liaison. L'affinité résultante pour l'agoniste NDP- α -MSH, qui est utilisé dans l'essai de fonctionnalité (figure 3.1B), pourrait alors être altérée, ce qui expliquerait les réponses différentes. Toutefois, il est aussi possible qu'une variation de la capacité de transduction des récepteurs traités avec les différentes CP soit responsable des effets observés, sans altération de l'affinité pour le NDP- α -MSH. Ses deux possibilités sont à considérer, et seront discutées dans la section Discussion.

En bref, les diverses conformations qui atteignent la surface cellulaire n'ont pas nécessairement la même efficacité à transduire le signal extracellulaire, que ce soit une question d'affinité pour le NDP- α -MSH ou pour la protéine G, car le système de contrôle de qualité se base sur des critères conformationnels plutôt que fonctionnels.

3.2 Mécanisme d'action des chaperones pharmacologiques

Tel que mentionné dans l'introduction, le principe de chaperone pharmacologique sur les RCPG a été démontré avec le récepteur V2 de la vasopressine (V2R) [102]. Il a précédemment été proposé que la CP spécifique au V2R, le **SR121463**, en plus de promouvoir l'expression à la surface cellulaire et la fonctionnalité de différents mutants retenus à l'intérieur de la cellule, favorisent la maturation du récepteur, soit par l'adoption d'une conformation correcte favorable à la sortie du RE permettant l'acquisition des modifications post-traductionnelles intrinsèques au récepteur telles que la glycosylation.

La N-glycosylation est amorcée dans le RE par l'ajout d'un oligosaccharide précurseur (figure 1.3) sur l'arginine des séquences consensus N-X-S/T [16-19]. Cet oligosaccharide est ensuite mûré (*processed*) par le retrait de 3 résidus glucoses et d'un des résidus mannose avant que la protéine puisse être acheminée au Golgi, où la maturation de

l'oligosaccharide se poursuit et se complexifie. Une fois au Golgi, le retrait de résidus de mannoses (citerne *cis* et médian) et l'ajout d'un nombre variable de résidus de N-acétylglucosamine (GlcNAc) (citerne médian), de galactose (citerne *trans*) et d'acide sialique (NANA) (citerne *trans*), se produisent séquentiellement dans les différents saccules pour achever la maturation du N-glycan [22]. Plus la glycoprotéine est avancée dans la voie de sécrétion, plus son (ou ses) N-glycan(s) seront complexes et ainsi, plus elles seront avancées dans leur stade de maturation. Les ajouts de résidus de sucre dès le saccule médian du Golgi permettent de distinguer les formes matures des glycoprotéines par l'augmentation de leur masse moléculaire apparente sur SDS-PAGE.

La variation de la masse moléculaire apparente par la N-glycosylation peut alors être utilisée comme outil pour suivre la maturation des RCPG N-glycosylés. L'action du **SR121463** sur la maturation du mutant *del 62-64* du V2R a d'ailleurs été démontrée dans le laboratoire du Dr. Bouvier par un marquage métabolique suivi de chasses à différents temps [102]. Alors que le V2R(WT) montre un gain de masse moléculaire apparente dans le temps, indiquant l'acquisition de N-glycosylation complexe, la masse moléculaire apparente du mutant reste au même niveau. Suite au traitement avec le **SR121463**, des bandes de plus haute masse moléculaire font leur apparition, indiquant la promotion de la N-glycosylation du mutant par la CP. La promotion de la glycosylation complexe du mutant confirme l'action de la CP **SR121463** sur la maturation du V2R.

À travers les résultats du V2R, une action sur la maturation peut être anticipée pour les CP **AT3163**, **AT3186** et **AT3228** sur le MC4R, si le mécanisme d'action est le même. Afin de vérifier l'effet des CP spécifiques au MC4R sur la maturation de ce récepteur, nous avons suivi le patron de migration du MC4R sur SDS-PAGE.

Notre étude étant basée sur celle du V2R, la majorité des expériences effectuées sur le MC4R ont été réalisées en parallèle sur le V2R à titre de contrôle positif. Les résultats du V2R (WT et W164S) en présence ou en absence de sa CP spécifique (**SR121463**) seront donc présentés préalablement à ceux du MC4R tout au long de ce mémoire.

3.2.1 Patron de migration du récepteur (variation du ratio mature/immature)

Tel que mentionné au cours des paragraphes précédents, la N-glycosylation affecte à la hausse la masse moléculaire apparente du récepteur plus ou moins grandement selon le degré d'arborisation du N-glycan, qui dépend de la position du récepteur dans la voie de sécrétion. Le degré de complexité du N-glycan est donc un reflet du degré de maturation du récepteur glycosylé. Selon cette considération, il est possible de suivre le changement du ratio de récepteur mature/immature en séparant les protéines sur SDS-PAGE et en révélant les bandes obtenues par un immunobuvardage de type Western. Il est attendu qu'un récepteur comportant une mutation causant la rétention intracellulaire voit son ratio mature/immature diminué.

Suite à un immunobuvardage de type Western du V2R(WT) et V2R(W164S) avec et sans traitement avec le **SR121463**, quatre bandes distinctives sont présentes chez le 3HA-V2R(WT) : à ~42kDa, à ~50-60kDa, à ~92kDa et à ~125kDa (figure 3.2A). Les formes à ~42kDa et à ~92kDa correspondent à la forme immature sous forme de monomère (I) et de dimère (I*), respectivement, tel que rapporté dans la littérature par Morello *et al.* [102, 105]. La forme mature (M) a aussi été identifiée dans ces publications et correspond à la bande à ~50-60kDa. La bande de plus haute masse moléculaire à ~125kDa correspond vraisemblablement au dimère de mature (M*). L'identité de chaque bande a aussi été confirmée par une digestion avec des endoglycosidases spécifiques (EndoH et PNGase F) à la figure 3.4, qui sera discutée plus loin. Après le traitement du V2R le **SR121463**, le patron du V2R(WT) n'est pas fortement altéré. Il semble y avoir un faible gain de la forme mature, ainsi qu'une diminution du dimère d'immature.

Dans le cas du mutant V2R(W164S) non traité, seules les bandes immatures (~42kDa et ~92kDa) sont détectées. Suite au traitement avec le **SR121463**, la bande correspondant au récepteur mature apparaît (~50-60 kDa), indiquant que cette CP favorise la N-glycosylation du mutant.

Le ratio mature/immature est plutôt fort pour le V2R(WT), tandis qu'il est très faible pour le W164S. Le traitement avec le **SR121463** augmente ce ratio pour le W164S, ce qui

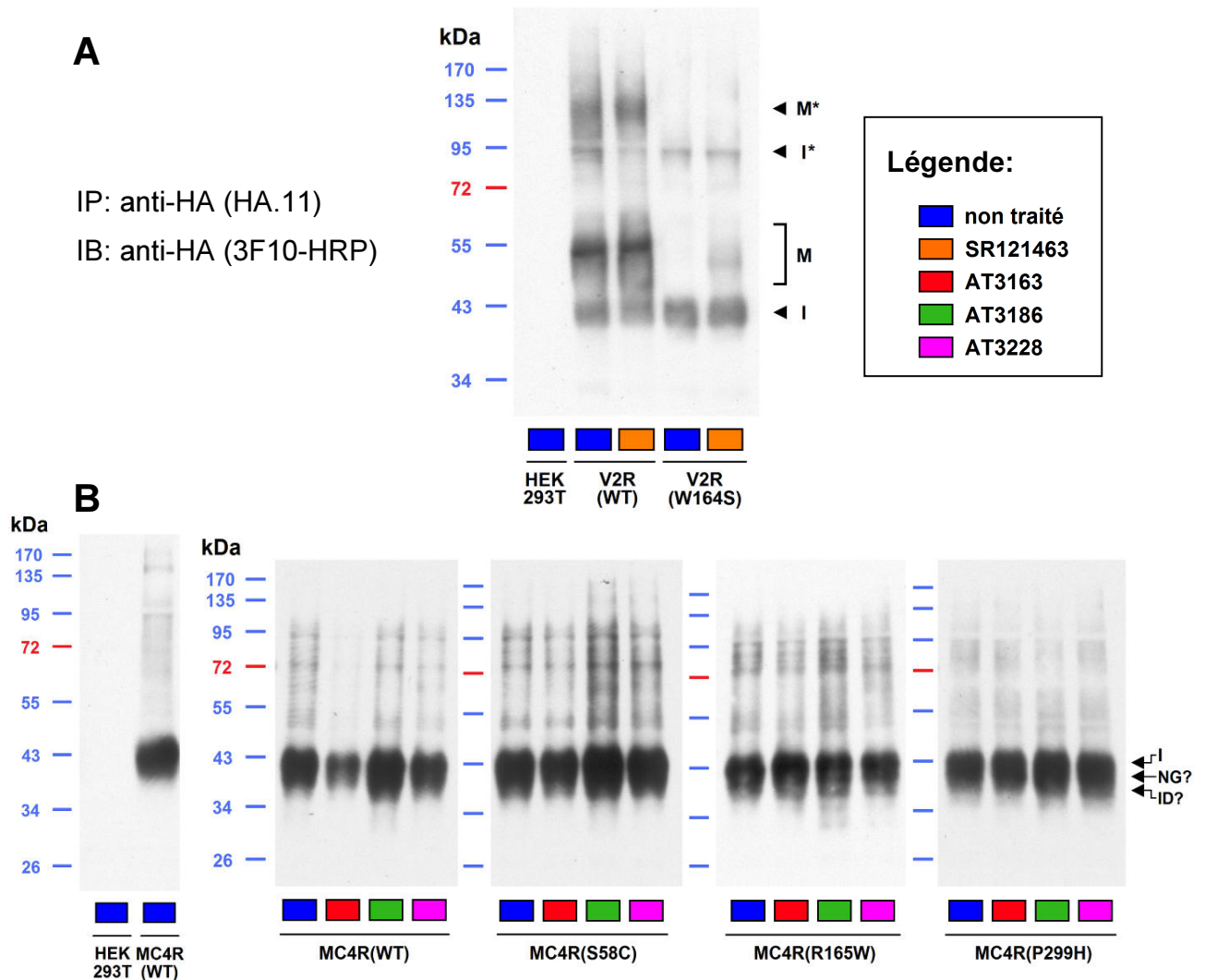


Figure 3.2. Profil de maturation du V2R et du MC4R. Des cellules exprimant de manière stable les protéines de fusion **(A)** 3HA-V2R(WT) ou 3HA-V2R(W164S) ou **(B)** 3HA-MC4R(WT), 3HA-MC4R(S58C), 3HA-MC4R(R165W) ou 3HA-MC4R(P299H) ont été récoltées et lysées suivant 16 h de traitement avec 10 μ M des différentes chaperones pharmacologiques **((A) SR121463, (B) AT3163, AT3186, AT3228)**. Les différentes protéines de fusion ont été ensuite immunoprécipitées en présence de l'anticorps anti-HA (HA.11 de Covance) et de billes protéine G-sépharose. L'éluat a été fractionné par SDS-PAGE et transféré sur une membrane PVDF. Les récepteurs ont été révélés avec un anticorps primaire anti-HA, pré-couplé à la peroxidase de raifort (HRP). Les formes immature (I), mature (M) et dimérique (*) ont été identifiées pour le V2R en fonction de ce qui a déjà été rapporté dans la littérature [102, 105]. L'identification des différentes formes du MC4R (en surexpression dans des cellules HEK293T) n'a pas encore été publiée. La bande entre à 43 kDa peut être identifiée comme étant immature selon la masse moléculaire prédite de la séquence en acides aminés. Les bandes à 37 kDa et à 40 kDa sont potentiellement un intermédiaire de dégradation (ID) et un précurseur non glycosylé (NG), respectivement. Les résultats sont représentatifs de 2 (B) ou 3 (A) expériences indépendantes. V2R non traité : sans DMSO. MC4R non traité : 0,1% DMSO.

confirme que la CP favorise la maturation (glycosylation) du récepteur mutant. Sachant qu'un récepteur situé au-delà du saccule médian du Golgi a pratiquement atteint la maturité (la masse moléculaire apparente ne varie plus beaucoup) [21], (tel que mentionné précédemment) le site d'action du **SR121463** doit alors nécessairement être en amont de ce site.

Nous nous attendions aux mêmes résultats pour le MC4R. Or, les patrons de migration des récepteurs WT, S58C, R165W et P299H sont très similaires les uns aux autres (figure 3.2B). Les seules variations visibles sont l'augmentation de l'expression totale du récepteur lorsque traité avec le composé agoniste **AT3186**, sauf pour le P299H, et la diminution de l'expression totale du WT avec l'**AT3163**. La bande entre 37 et 43 kDa correspond probablement à la forme immature. La bande du R165W permet de voir au moins 3 bandes distinctes : une à 37 kDa, une à 40 kDa et une à 43 kDa. Ces 3 bandes pourraient possiblement correspondre à un intermédiaire de dégradation, un précurseur non glycosylé (la masse moléculaire attendue du 3HA-MC4R étant de ~40 kDa) et une forme immature (glycosylée avec des oligosaccharides précurseurs), respectivement. Aucune bande de plus haute masse moléculaire apparente ne se démarque comme étant la forme mature, même après le traitement avec les différentes chaperones pharmacologiques. Ceci est surprenant étant donné la promotion de l'expression à la surface cellulaire suite au traitement avec les CP observée à la figure 3.1B. Les bandes révélées par immunobuvardage sont spécifiques car elles sont absentes dans le puits du contrôle négatif (HEK293T), qui est une immunoprécipitation (IP) anti-HA sur le lysat total de cellules HEK293T n'exprimant pas le récepteur étiqueté 3HA (figure 3.2B).

La différence des profils de migration du V2R et du MC4R suggère 2 hypothèses. La première étant l'absence de forme glycosylée de manière complexe (et ainsi la présence de récepteur MC4 immature à la surface cellulaire), et la deuxième étant que la proportion de MC4R matures par rapport aux MC4R immatures soit trop faible pour être détectée sur l'immunobuvardage d'une IP sur lysat cellulaire total. En effet, en supposant que la quantité de récepteurs immatures du MC4R soit largement supérieure à celle des récepteurs matures, il ne serait pas étonnant que la détection des deux formes sur un même immunobuvardage soit difficile, par un effet de contraste. Si tel est le cas, il faudrait augmenter le ratio mature/immature dans nos échantillons pour pouvoir détecter la forme de plus haute masse moléculaire apparente. En supposant que la forme mature est principalement à la surface cellulaire et que la forme immature est majoritairement à

l'intérieur de la cellule, les récepteurs présents à la membrane plasmique ont été enrichis par une immunoprécipitation de surface (IP de surface).

3.2.2 Enrichissement des récepteurs présents à la surface cellulaire

Pour ce faire, des cellules entières non perméabilisées exprimant le récepteur étiqueté 3HA de manière stable sont incubées en présence de l'anticorps anti-HA (voir figure explicative 3.3). L'excédant d'anticorps est éliminé par des lavages et les cellules sont lysées avec un détergeant doux. Les noyaux et autres débris non désirés sont éliminés par centrifugation. Les récepteurs qui étaient présents à la surface cellulaire avant la lyse sont immunoprécipités par l'ajout de billes de sépharose couplées à la protéine G. Les échantillons sont ensuite fractionnés par un SDS-PAGE et révélés par immunobuvardage de type Western. En procédant de cette manière, cet essai permettra de révéler le profil de maturation des récepteurs présents à la surface. Basé sur la masse moléculaire apparente, nous pourrions déterminer la nature mature ou immature des différentes formes, qui sera ultérieurement confirmée par des digestions avec des endoglycosidases spécifiques (Endo H et PNGase F). En supposant que les formes présentes à la surface sont matures (étant donné leur passage dans le Golgi), une plus forte présence de récepteur mature serait attendue.

3.2.2.1 IP de surface du V2R

L'IP de surface du V2R démontre la validité de cet essai en montrant une augmentation du ratio mature/immature (figure 3.4A) par rapport à l'IP sur le lysat total (figure 3.2A) par la quasi disparition de la forme immature. Le traitement avec le **SR121463**, une CP spécifique au V2R, ne change pas le patron d'expression à la surface cellulaire du V2R(WT) tel qu'il a été vu en cytométrie de flux (figure 7.2, annexe). Alors qu'aucune trace du V2R(W164S) n'est visible à la surface cellulaire en situation **non traité**, le rétablissement de l'expression à la membrane plasmique peut être observé suite à un traitement avec le **SR121463**. Une exposition prolongée du même immunobuvardage (figure 3.4A, encart) amplifie cette différence de patron et confirme l'absence de récepteur W164S mature sans traitement. La piste du W164S **non traité** n'est toutefois pas vide dû à un problème technique, étant donné la présence d'une faible bande correspondant à

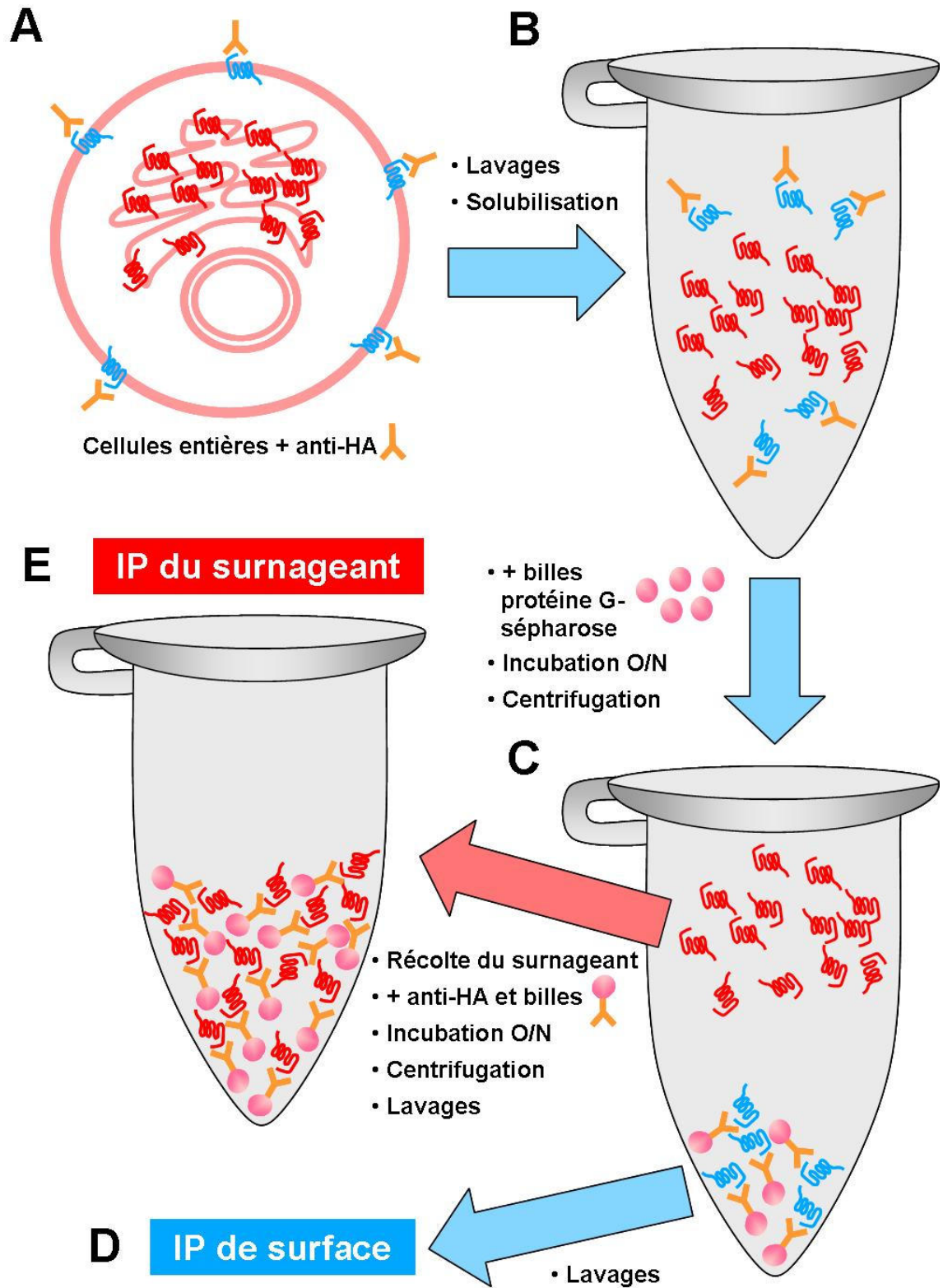


Figure 3.3. Principe de l'immunoprécipitation de surface. Rouge : récepteur immature. Bleu récepteur mature (présent à la surface). Les détails de l'IP de surface sont expliqués dans le texte et sont indiqués sur le schéma, en ordre chronologique, de A à E.

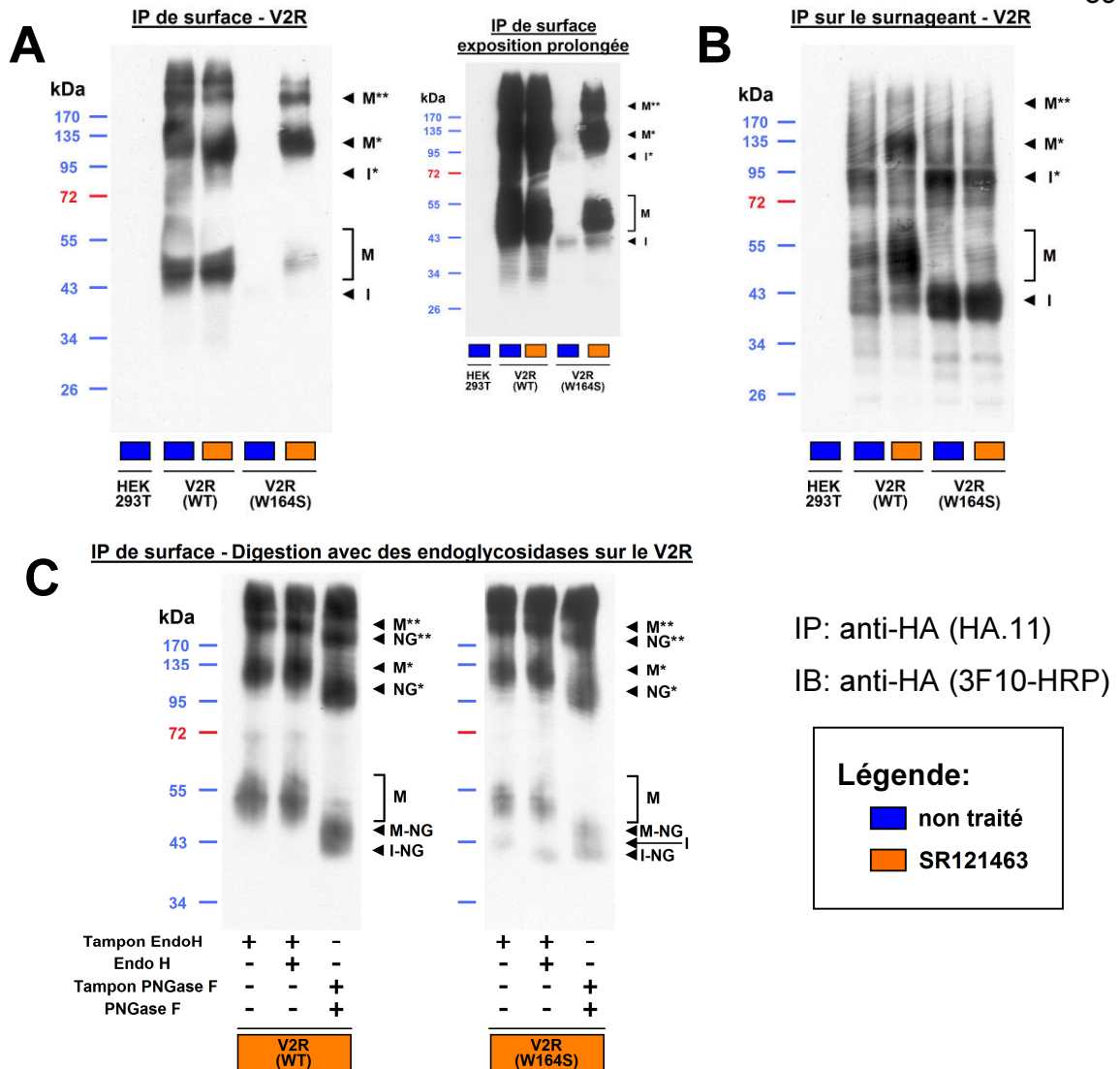


Figure 3.4. Identification des formes matures et immatures du V2R. *IP de surface du V2R (A).* Les récepteurs à la surface cellulaire ont été immunoprécipités en hybridant l'anticorps anti-HA sur des cellules entières exprimant de manière stable les récepteurs 3HA-V2R (A). Les cellules sont ensuite lysées et les complexes anticorps-antigène sont immunoprécipités suite à l'ajout de billes de sépharose-protéine G. Les récepteurs à la surface cellulaire sont donc ainsi isolés de la population totale de récepteurs. L'encart pour le V2R représente une exposition plus longue du même immunobuvardage présenté en (A), afin de montrer que la 3^e piste n'est pas vide dû à un problème technique. *IP du surnageant du V2R (B).* Le surnageant obtenu suite à cette IP est recueilli pour récolter le reste des récepteurs intracellulaires par une 2^e IP (IP du surnageant) afin d'avoir un indicateur de la quantité totale de récepteur (contrôle de chargement inter-mutant). *Digestion avec des endoglycosidases sur l'IP de surface du V2R (C).* Une IP de surface sur des cellules mises en culture dans des pétris 150mm et traitées au SR121463 a été éluée avec 1% SDS-50 mM phosphate de sodium pH7,5 a été séparée en 3 pour les 3 conditions suivantes : contrôle (sans enzyme, dans le tampon EndoH), avec endoglycosidase H (EndoH) et avec peptide N-Glycosidase F (PNGase F), chacun dans leur tampon respectif. La forme immature est sensible aux 2 enzymes, tandis que la forme mature n'est sensible qu'à la PNGase F. Les formes immature (I), mature (M), déglycosylée (NG), dimérique (*) et oligomérique (**) ont été identifiées. Les résultats montrés en (A), (B) et (C) sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

l'imature, qui est probablement due à de la contamination par les récepteurs intracellulaires. Afin de montrer qu'il n'est pas question d'un problème d'expression cellulaire du W164S, la portion de récepteur intracellulaire correspondant à cette condition a été révélée : il s'agit en fait d'une immunoprécipitation sur le surnageant obtenu après l'IP de surface (IP du surnageant), qui agit à titre de contrôle de chargement (figure 3.4B). Ceci permet de révéler la portion de récepteur intracellulaire (IP du surnageant) par rapport à la portion de récepteur à la membrane plasmique (IP de surface) pour un même échantillon de cellules (voir figure explicative 3.3C et E). La présence de récepteurs intracellulaire dans la condition W164S **non traité** ainsi qu'un niveau d'expression similaire avec les pistes voisines confirme qu'il ne s'agit pas d'un problème d'expression de cette condition (figure 3.4B).

Un essai de sensibilité aux enzymes endoglycosidases EndoH et PNGase F a été exécuté sur des IP de surface en présence de traitement avec le **SR121463** afin de reconfirmer la taille exacte des différentes formes présentes à la surface cellulaire (figure 3.4C). Effectivement, l'étape du retrait de résidus mannose par la mannosidase du Golgi II dans le saccule médian de l'appareil de Golgi est critique dans la perte de reconnaissance de l'oligosaccharide par l'endoglycosidase H (EndoH), tandis qu'elle n'a pas d'effet sur celle de la PNGase F. Autrement formulé, les formes immatures sont sensibles aux 2 enzymes, tandis que la forme mature n'est sensible qu'à la PNGase F (figure 1.3).

Selon cette logique, la forme de 43 kDa (seulement visible sur l'immunobuvardage du W164S traité avec le **SR121463**, puisque les digestions sont faites sur des IP de surface et qu'il n'y a pas de contamination pour le WT) étant sensible à l'EndoH correspond à la forme immature (I) (figure 3.4C). Le 3HA-V2R à ~53 kDa correspond à la forme mature (M), étant donné qu'elle est résistante à l'EndoH, et celui à 115-135 kDa, à son dimère (M*). Les formes présentes au dessus de 170 kDa (M**) sont des oligomères de forme mature. Les bandes observés à ~42-49 kDa, ~95-115 kDa et juste au-dessus de 170 kDa dans la piste des échantillons digérés avec la PNGase F correspondent aux formes déglycosylées sous forme de monomère, de dimère et d'oligomère respectivement (NG, NG* et NG**). La forme mature déglycosylée (M-NG) a une masse moléculaire apparente plus grande que la forme immature déglycosylée (I-NG), ce qui est probablement dû à la présence d'O-glycosylation [102]. Le même profil de migration est observé pour le V2R(W164S).

3.2.2.2 IP de surface du MC4R

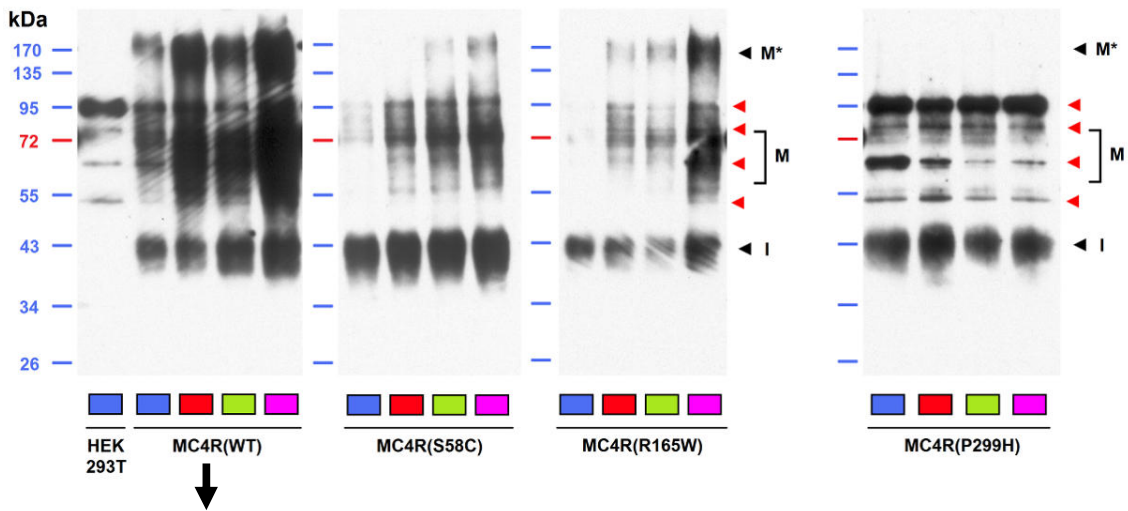
L'essai ayant été validé avec le V2R, il est appliqué au MC4R afin de voir si une forme mature (de plus haute masse moléculaire apparente) peut être détectée pour ce récepteur, ce qui confirmerait l'hypothèse d'un ratio de récepteur mature/immature trop faible. Le succès de l'IP de surface à augmenter le ratio mature/immature dans nos échantillons pour le MC4R est montré à la figure 3.5B : il y a apparition de formes de plus haute masse moléculaire apparente chez le WT **non traité** (~55-90 kDa). Ces formes ne sont pas ou peu présentes chez les mutants **non traités**, ce qui corrèle avec la faible expression à la surface cellulaire en absence de traitement mesurée par cytométrie de flux (figure 3.1A). Suite au traitement avec les diverses chaperones, cette large bande augmente pour le WT et les mutants S58C et R165W, ce qui suit toujours les résultats de la figure 3.1A. Ces nouvelles bandes de plus haute masse moléculaire apparente ne sont pas distinguables sur le profil du P299H. Un certain nombre de bandes se retrouvent dans la piste du contrôle négatif (HEK293T). La présence de bandes de même masse moléculaire dans le profil des IP de surface des récepteurs est attribuée à un signal non spécifique au MC4R.

Malgré la hausse du ratio mature/immature du MC4R par l'IP de surface, ce ratio est nettement plus faible que dans le cas du V2R. Cette différence dans le ratio des deux récepteurs est non seulement attribuée à une plus faible quantité de MC4R mature par rapport au V2R mature, mais aussi à une plus forte quantité de MC4R immature, qui est pratiquement absent dans l'IP de surface du V2R.

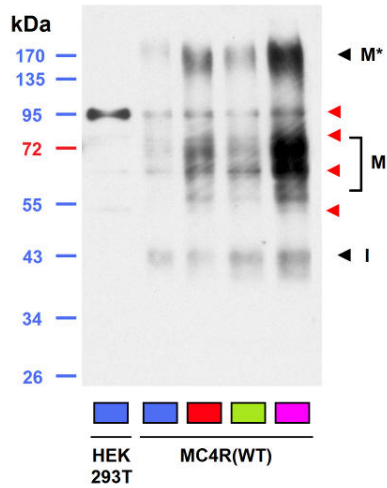
La détection de forme immature dans les échantillons d'IP de surface pourrait laisser croire qu'il y a présence de récepteur immature à la surface. Avant de venir à cette conclusion, une autre option est à considérer. Nous croyons en effet que ce phénomène soit probablement plutôt dû à une contamination par les récepteurs intracellulaires dans l'essai. En effet, la lyse mécanique de cellules au cours de l'incubation des cellules entières avec l'anticorps ainsi que la présence d'anticorps libres malgré les lavages avant la lyse cellulaire pourraient être les sources de cette contamination. Les niveaux d'immature du MC4R et du V2R en IP de surface seraient alors proportionnels à la quantité d'immature présente à l'intérieur des cellules, ce qui est d'ailleurs observé. Ceci corrèle avec notre hypothèse selon laquelle la population de MC4R soit majoritairement

A

IP de surface MC4R



IP de surface MC4R(WT)
exposition moins prolongée



IP: anti-HA (HA.11)

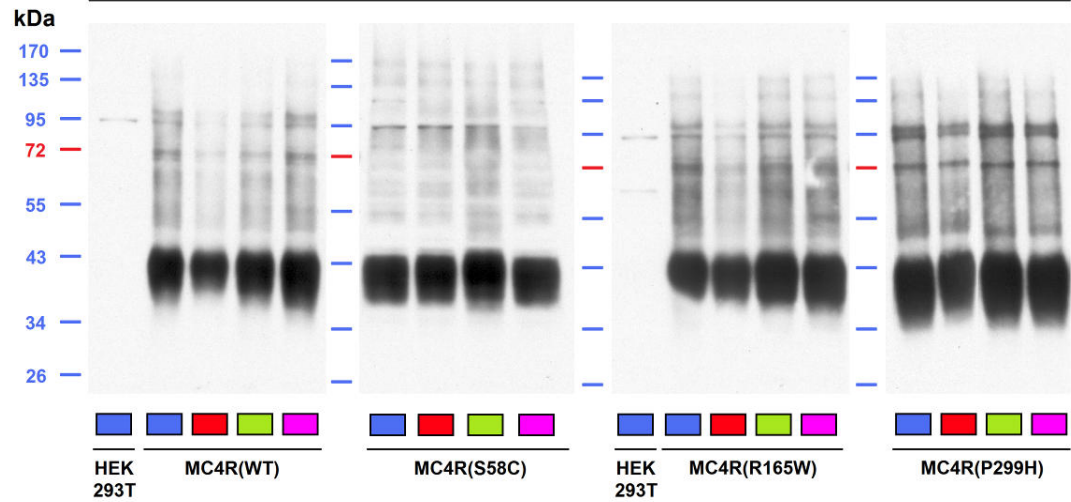
IB: anti-HA (3F10-HRP)

Légende:

- non traité
- AT3163
- AT3186
- AT3228

B

IP du surnageant MC4R



C

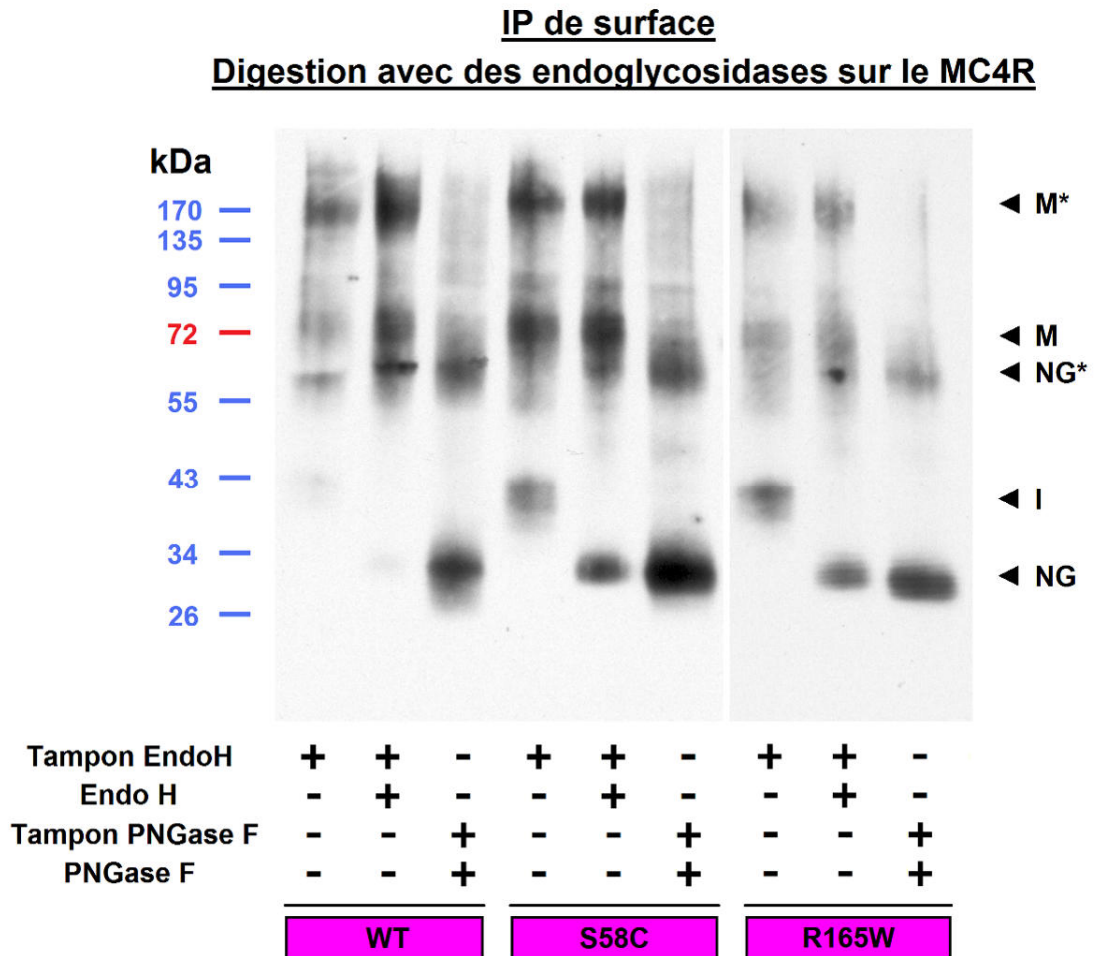


Figure 3.5. Identification des formes matures et immatures du MC4R (A et B: page précédente, C). *IP de surface du MC4R (A).* Les récepteurs à la surface cellulaire ont été immunoprécipités en hybridant l'anticorps anti-HA sur des cellules entières exprimant de manière stable les récepteurs 3HA-MC4R (A). Les cellules sont ensuite lysées et les complexes anticorps-antigène sont immunoprécipités suite à l'ajout de billes de sépharose-protéine G. Les récepteurs à la surface cellulaire sont donc ainsi isolés de la population totale de récepteurs. Les différentes formes ont été identifiées selon les résultats obtenus en (C). *IP du surnageant du MC4R (B).* Le surnageant obtenu suite à cette IP est recueilli pour récolter le reste des récepteurs intracellulaires par une 2^e IP (IP du surnageant) afin d'avoir un indicateur de la quantité totale de récepteur (contrôle de chargement inter-mutant). *Digestion avec des endoglycosidases sur l'IP de surface du MC4R (C).* Une IP de surface sur des cellules mises en culture dans des pétris 150mm et traitées avec l'**AT3228 (C)** a été éluée avec 1% SDS-50 mM Phosphate de sodium pH7,5 a été séparée en 3 pour les 3 conditions suivantes : contrôle (sans enzyme, dans le tampon EndoH), avec endoglycosidase H (EndoH) et avec peptide N-Glycosidase F (PNGase F), chacun dans leur tampon respectif. La forme immature est sensible aux 2 enzymes, tandis que la forme mature n'est sensible qu'à la PNGase F. Les formes immature (I), mature (M), déglycosylée (NG), dimérique (*) et oligomérique (**) ont été identifiées. Les résultats sont représentatifs de 2 (C) ou 3 (A, B) expériences indépendantes.

présente sous forme immature (figure 3.2), contrairement au V2R. De plus, le fait que la forme immature ne varie pas avec les traitements appuie encore une fois l'option de la contamination par l'immature intracellulaire plutôt que la présence d'immature à la surface. Le cas échéant, la bande immature aurait aussi été augmentée suite aux traitements avec les CP. Le maintien d'un même niveau d'intensité de la bande immature avec ou sans traitement permet de confirmer que l'augmentation de la proportion de récepteur mature par les CP (vs **non traité**) est bien réelle et que l'augmentation de la bande mature n'est pas causée par le chargement d'une plus grande quantité d'échantillon sur le gel.

Étant donné que les échantillons sont immunoprécipités, le contrôle de chargement des puits entre les conditions d'une même construction ne peut être fait en révélant la présence d'une protéine essentielle aux fonctions cellulaires de base (*house-keeping protein*). Il a fallu se fier au fait que les différents traitements ont été fait sur une même quantité de cellules de départ. Il est pris en considération que les CP n'affectent pas la prolifération cellulaire. Cette option ne peut être écartée, mais aucune différence de densité cellulaire n'a été observée par microscopie.

Pour pouvoir faire une comparaison entre les divers mutants, nous avons contrôlé pour la quantité totale de récepteur. Comme les résultats de la figure 3.2 et de la figure 3.3A laissent supposer que la quantité de récepteurs immature tend vers la quantité totale de récepteurs pour le MC4R, nous avons pris avantage du niveau d'expression des récepteurs restants (immatures) à l'intérieur de la cellule. En utilisant le surnageant obtenu suite à l'IP de surface (étape C du schéma figure 3.3), une IP anti-HA a permis de récupérer les MC4R résiduels exprimés dans la cellule. Ces échantillons ont ensuite été séparés sur SDS-PAGE pour ensuite en faire un immunobuvardage de type Western. La quantité de récepteurs visibles sur l'immunobuvardage a été normalisée entre les différentes constructions 3HA-MC4R afin d'obtenir une quantité de récepteur uniforme de clone en clone sur l'immunobuvardage. À partir de cette normalisation, la quantité de d'échantillon d'IP de surface à mettre sur gel a été ajustée proportionnellement. Il est à noter que cette normalisation se fait entre les diverses constructions et non pas entre les conditions traité et non traité d'un même mutant. Comme contrôle de chargement, on peut voir par l'IP du surnageant (figure 3.5B) que la quantité de récepteurs mise sur gel est approximativement la même. Le fait qu'il ait fallu mettre une plus grande quantité d'échantillon sur gel dans le cas de l'IP de surface du P299H pour arriver à une même

quantité de récepteur total (ajustée par l'IP du surnageant) explique qu'il y ait une plus forte présence de bandes non spécifiques que pour les autres mutants.

Afin de confirmer que les nouvelles bandes observées chez le MC4R correspondent bel et bien à la forme mature, le même essai de sensibilité aux enzymes endoglycosidases EndoH et PNGase F a été effectué (figure 3.5C). Pour une question de détection, les essais ont été faits en présence de la CP **AT3228**, toujours en enrichissant les récepteurs à la membrane plasmique par une IP de surface, pour optimiser la quantité de récepteur à manipuler. Des digestions ont aussi été effectuées sur des IP de lysat cellulaire (données non montrées), mais les digestions du 3HA-MC4R(WT) avec l'EndoH et la PNGase F ont donné le même patron, indiquant qu'il n'y avait pas de forme mature détectable.

À la figure 3.5C, les digestions avec les endoglycosidases sur le WT, le S58C et le R165W sont montrées. Le P299H ne bénéficiant pas d'un gain considérable d'expression à la surface cellulaire, l'essai n'a pas été exécuté pour ce mutant. En présence d'EndoH, la forme immature (I) de 40 à 43 kDa chute au niveau de la forme déglycosylée (NG) (31 à 35 kDa), tandis que les formes matures (M) de 70 à 74 kDa et à 170 kDa ne bougent pas. Ce n'est qu'en présence de PNGase F que ces 2 dernières migrent entre 31 à 35 kDa et à 62 kDa, respectivement, confirmant ainsi leur nature. La bande à 170 kDa est probablement un dimère ou oligomère de forme mature (M*) et la forme à 62 kDa, un dimère de récepteurs déglycosylés (NG*). Il n'y a pas de différence entre le patron de migration des différentes formes du WT et des mutants. Un fait intéressant à noter est que la digestion du V2R avec les endoglycosidases montre un moins grand déplacement (*shift*) des formes digérées que le MC4R, ce qui peut être attribué à leur nombre respectif de site de N-glycosylation, soit 1 pour le V2R, et 4 pour le MC4R.

De ces expériences, il peut être conclu que le faible ratio mature/immature est à la source de l'absence de récepteur MC4R sur les immunobuvardages des IP du lysat total (figure 3.2B). Ce ratio est tellement faible que la forme mature ne peut être visualisée par contraste avec la forte intensité de l'immature sur les IP du lysat total. Les différentes formes vues en IP de surface ont été confirmées par la digestion avec les endoglycosidases EndoH et PNGase F. Une faible cinétique de maturation pour le MC4R est alors suspectée. Toutefois, l'expression du MC4R dans un système hétérologue pourrait causer la forte rétention intracellulaire : le MC4R a peut-être besoin d'une protéine

accessoire pour assurer son bon trafic vers la membrane plasmique, tel qu'il est le cas pour le MC2R [77].

Les composés **AT3163**, **AT3228** et **AT3186**, en plus d'augmenter l'expression à la surface cellulaire du MC4R (figure 3.1A), semblent favoriser la maturation du récepteur (figure 3.5). Une promotion de la maturation par les CP ne peut être confirmée, puisque l'essai d'IP de surface ne permet que de voir *apparaître* la forme mature à la membrane plasmique, et non pas de *suivre* la maturation. Les CP pourraient agir sur la promotion du transport de récepteurs déjà matures retenus dans le réseau trans-golgien, sans favoriser la maturation. Il peut toutefois être suggéré que les CP favorisent la maturation du MC4R, puisque cet effet est observé par un marquage métabolique pour au moins 2 autres RCPG avec leur CP respectives, soit le V2R [102] et le δ OR [107].

Sachant que les CP favorisent le trafic des MC4R mutants à la membrane plasmique (cytométrie de flux et IP de surface – figures 3.1 et 3.5), et qu'à première vue, semblent favoriser la maturation (IP de surface – figure 3.5), nous avons émis l'hypothèse que le site d'action des CP soit précoce dans le processus de maturation, soit au niveau du RE. En effet, nous supposons que les CP puissent stabiliser une conformation favorable à la dissociation du système de contrôle de qualité du RE et à l'export vers la membrane plasmique, tel qu'il a été observé pour le V2R.

3.2.3 Essai de proximité du récepteur avec la calnexine dans le RE suivi par BRET

Des résultats obtenus dans le laboratoire avec le V2R semblent confirmer que le site d'action de la chaperone pharmacologique spécifique au V2R, le **SR121463**, soit au niveau du RE (résultats non publiés générés par Virginie Bernier, ancienne étudiante au doctorat dans le laboratoire du Dr. Bouvier). En effet, des coimmunoprécipitations séquentielles, suite à un marquage métabolique du V2R, entre le V2R et une protéine chaperon résidente du RE impliquée dans le repliement et la rétention des protéines mal repliées, la calnexine (CNX), a permis de montrer que le traitement avec le **SR121463** fait diminuer le temps d'interaction entre la CNX et le mutant V2R(W164S).

Afin de vérifier que les CP spécifiques au MC4R agissent au niveau du RE, un essai de BRET a été mis en place pour suivre la modulation de l'interaction entre le récepteur et la CNX en présence ou absence de traitement avec les diverses CP.

3.2.3.1 Transfert d'énergie de bioluminescence par résonance (BRET)

3.2.3.1.1 Principe

Le transfert d'énergie de résonance par bioluminescence (BRET) est une technique qui permet l'étude de la proximité de protéines en temps réel dans des cellules vivantes (voir figure 3.6). Le principe du BRET repose sur le transfert non-radiatif d'énergie entre un donneur luminescent (*Renilla* luciférase) et un accepteur d'énergie (une protéine fluorescente) [121]. Si la distance qui les sépare est plus petite que 100 Å et que leur orientation l'un par rapport à l'autre est favorable [116], l'énergie produite suite à la dégradation catalytique de la coelenterazine par la *Renilla* luciférase (Luc) sera transférée à la protéine fluorescente, qui émettra de la lumière à son tour à une longueur d'onde qui la caractérise. Une telle proximité pourrait être atteinte dans le cadre d'une interaction directe et/ou suite à une collision aléatoire dans le contexte d'un organite très dense en protéine. Dans le cadre de cette étude, la protéine fluorescente Venus, une forme mutante de la protéine jaune fluorescente (*enhanced yellow fluorescent protein*, eYFP) a été utilisée comme accepteur. Le signal de BRET est obtenu en faisant le ratio de lumière émise par la protéine fluorescente (510-550 nm) sur celle de la luciférase (460-500 nm). Les valeurs de BRETnet peuvent être obtenues en retirant le BRET basal, qui est le signal de BRET détecté lorsque la Luc est exprimée seule, et sont mises en graphe en fonction du signal de fluorescence de la Venus.

Afin de voir si l'action des CP est au niveau du RE, une courbe de saturation entre le récepteur étiqueté en C-terminal avec le donneur d'énergie (Luc) et la CNX étiquetée l'accepteur d'énergie (Venus) a été exécutée, avec et sans traitement. L'étiquette Venus a été placée en C-terminal de la CNX pour 2 raisons. Tout d'abord, pour être dans le même compartiment que le donneur d'énergie placé en C-terminal du récepteur, soit dans le cytosol. Ensuite, pour ne pas interférer avec l'activité de la CNX, puisque le domaine d'interaction est dans la lumière du RE.

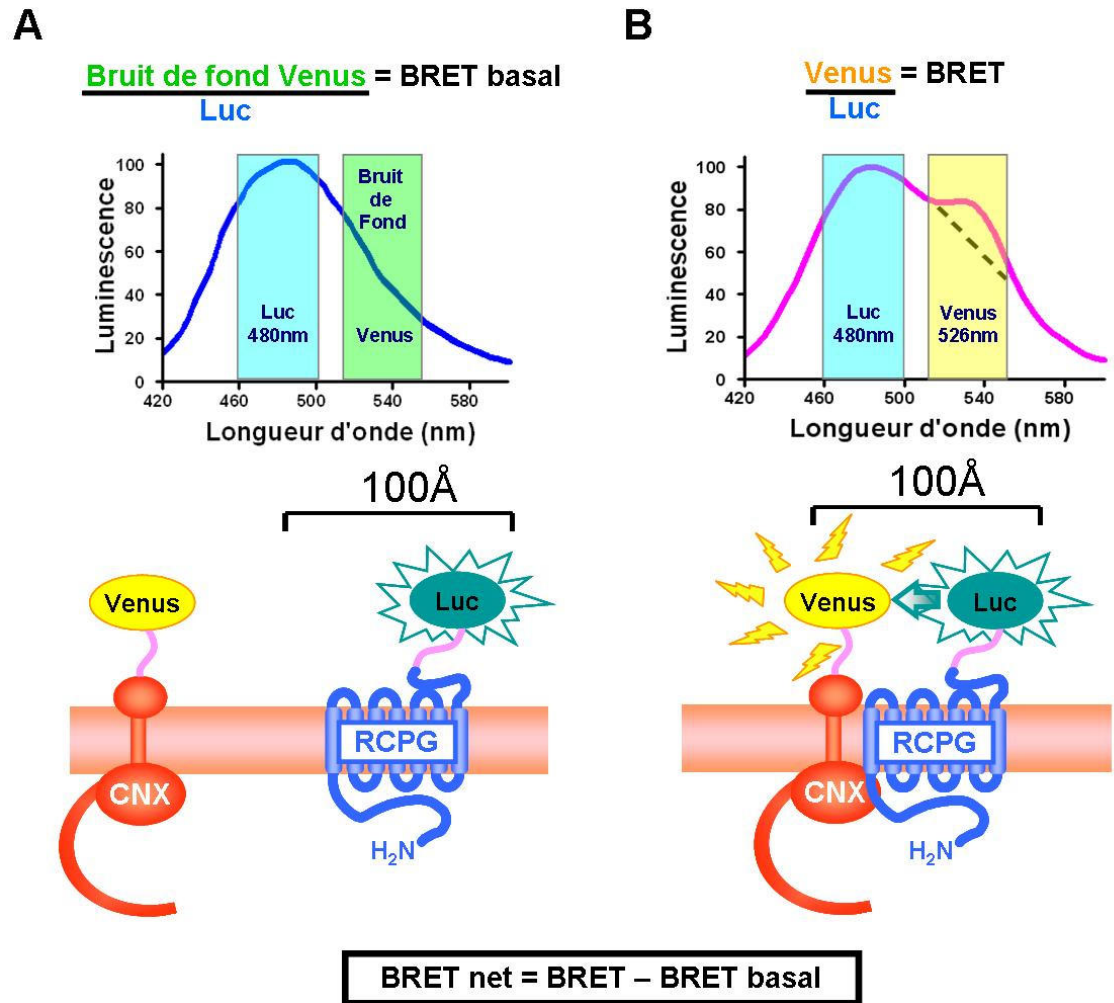


Figure 3.6. Principe du transfert d'énergie de bioluminescence par résonance (BRET). Spectre d'émission de la luciférase (Luc) en absence A) ou en présence B) de BRET.

3.2.3.1.2 Courbes de saturation

Une quantité croissante d'accepteur (CNX-Venus) est transfectée conjointement à une quantité fixe de donneur (récepteur-Luc), jusqu'à ce que le donneur soit saturé (figure 3.7A). L'accepteur en surplus ne pouvant émettre de fluorescence par lui-même, le signal de BRET atteint un plateau, nommé BRETmax, qui est un indicateur semi-quantitatif de la quantité de récepteur-Luc à proximité ($<100 \text{ \AA}$) de la CNX-Venus. Il est habituellement rapporté que l'obtention d'une courbe hyperbolique (saturabilité) reflète une interaction spécifique entre les 2 protéines [122]. Une interaction non spécifique n'est normalement pas saturable, sauf dans le cas où une concentration importante de protéines dans un volume circonscrit provoque la proximité des partenaires de BRET. Dans le cadre du système utilisé, le BRET serait effectivement plutôt un reflet de la proximité des interacteurs. En effet, la saturation serait plutôt associée à la grande densité de protéines présentes dans le RE par la surexpression de protéines membranaires. Pour une quantité de récepteur-Luc donnée, l'obtention d'un plateau (BRETmax) indiquerait la saturation du récepteur par la CNX-Venus probablement par l'action combinée de proximité et d'interaction spécifique entre les deux partenaires (figure 3.7, à gauche). Plus le récepteur est retenu dans le RE (si le site de rétention est bien le RE), plus il y a de possibilités de former des couples de BRET, plus il y a un grand BRETmax. Comme le traitement avec une CP favorise l'expression à la surface cellulaire (tel qu'observé à la figure 3.1), si son action est au niveau du repliement du récepteur mutant tel que prédit, ce récepteur-Luc devrait transiter plus rapidement vers le Golgi : il serait alors attendu que le traitement avec une CP favorise l'export du récepteur hors du RE, faisant ainsi diminuer le nombre d'interactions (directes et/ou indirectes) à l'équilibre entre le récepteur et la CNX. La sortie du donneur d'énergie du RE, hors d'atteinte de l'accepteur CNX-Venus, ferait d'autant plus diminuer le BRETmax par rapport à la situation sans traitement (figure 3.7, à droite). Pour une CP rétablissant l'expression à la surface cellulaire au même niveau que le WT, il serait attendu de voir le BRETmax du mutant atteindre un niveau similaire à la situation non traité du récepteur WT.

La diminution du temps d'interaction entre le V2R(W164S) et la CNX suite à un traitement avec la CP **SR121463** ayant été confirmée (résultats non publiés, Virginie Bernier), l'observation du même effet entre le V2R(W164S)-Luc et la CNX-Venus par BRET permettra de valider l'essai et agira à titre de contrôle positif pour le MC4R.

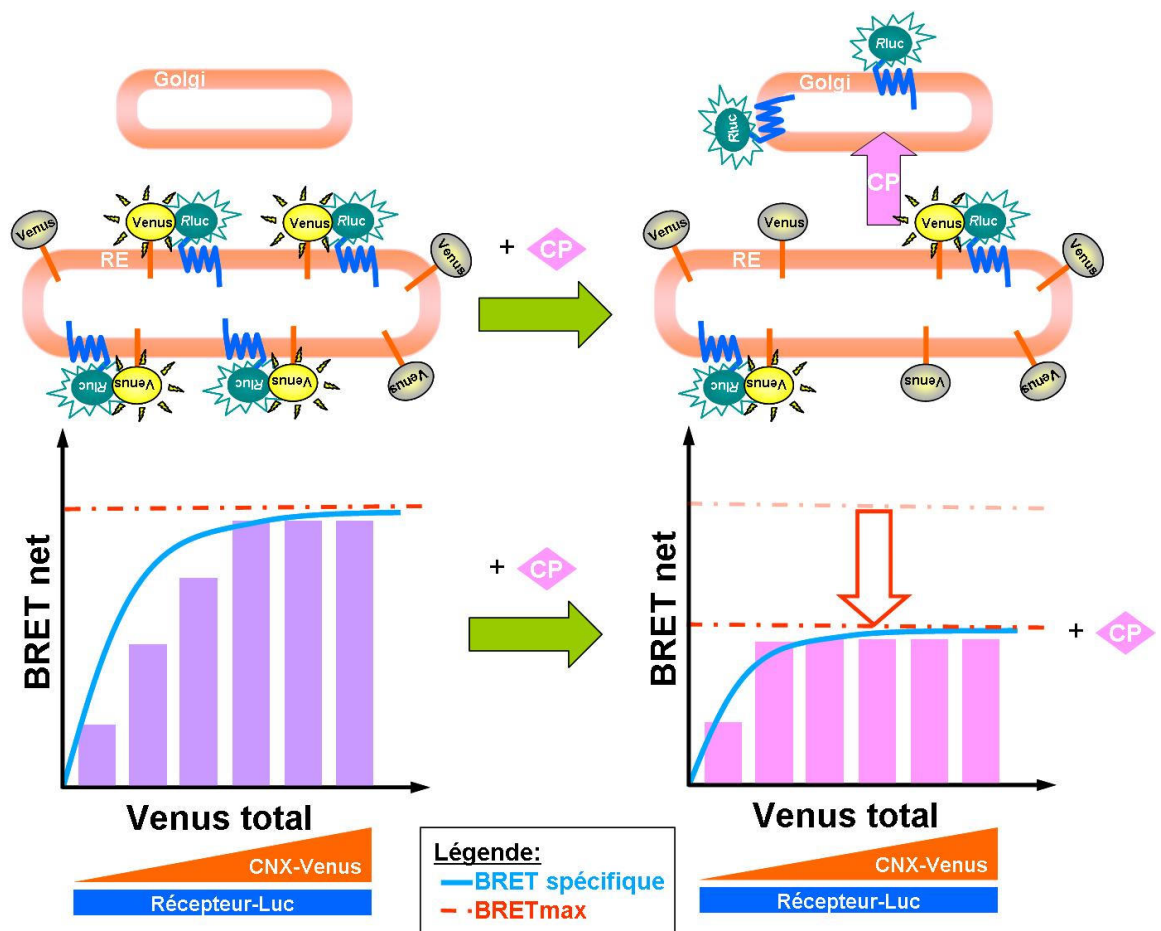


Figure 3.7. Principe des courbes de saturation du récepteur-Luc par la calnexine-Venus en BRET dans le cas d'un récepteur mutant retenu dans le RE (hypothèse). Protéine fluorescente Venus : jaune lorsque BRET, gris lorsque sans partenaire d'interaction. Luciférase (RLuc) : couleur bleu sarcelle.

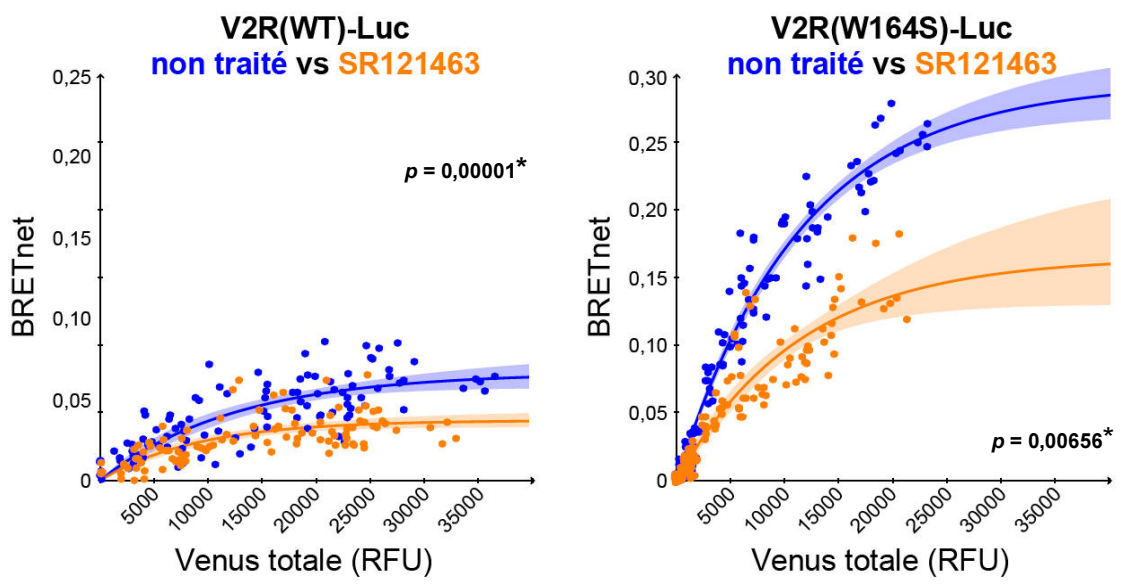
Une coimmunoprécipitation de la CNX-Venus avec le V2R a préalablement permis de confirmer que l'étiquette Venus en C-terminal de la CNX ne compromet pas la liaison avec le récepteur (résultats non montrés, générés par Morad Oueslati, stagiaire post-doctoral dans le laboratoire du Dr. Bouvier). Le plus faible niveau d'expression possible du récepteur a été utilisé (toujours détectable au lecteur de BRET) afin de favoriser la détection d'une sortie du RE.

3.2.3.2 Essai de proximité du récepteur avec la calnexine dans le RE suivi par BRET

Tel qu'observé à la figure 3.8A, la courbe de saturation du V2R(WT)-Luc avec la CNX-Venus en situation **non traité** donne un signal de BRET saturable (BRETmax) de l'ordre de 0,081. Les intervalles de confiance sont affichés dans le tableau de la figure 3.8A, et les BRETmax de chaque condition ont été comparées sur un histogramme à la figure 3.8C. Le mutant V2R(W164S) (figure 3.8A, à droite), montre un BRETmax beaucoup plus élevé (0,294), indiquant qu'il y a une plus grande proportion de récepteur dans le RE pour des valeurs de Luc et Venus comparables, tel qu'attendu. Le traitement avec le **SR121463** (qui, rappelons-le, rétablit l'expression à la membrane plasmique du V2R(W164S) au niveau du V2R(WT) **non traité** (voir figure 7.2, annexe) et augmente la proportion de récepteur mature (figure 3.2)) fait diminuer le BRETmax du mutant W164S de l'ordre de ~43% en atteignant une valeur de 0,168, indiquant une diminution de l'interaction directe et/ou indirecte du V2R(W164S) avec la CNX. Quoique le traitement du V2R(W164S) avec le **SR121463** fasse baisser le BRET de manière statistiquement significative par rapport au V2R(W164S) **non traité**, le BRETmax du mutant traité ne rejoint pas celui du V2R(WT) **non traité** (0,044). Le traitement du V2R(WT) avec le **SR121463** fait aussi diminuer le BRETmax du même ordre (~45%), pourtant l'expression à la surface cellulaire n'est pas augmentée grandement.

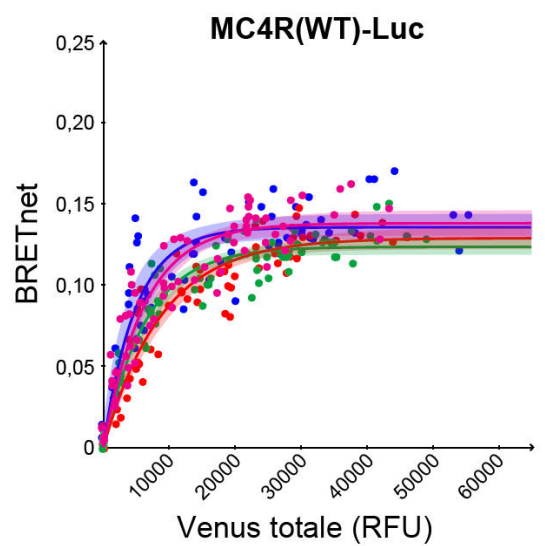
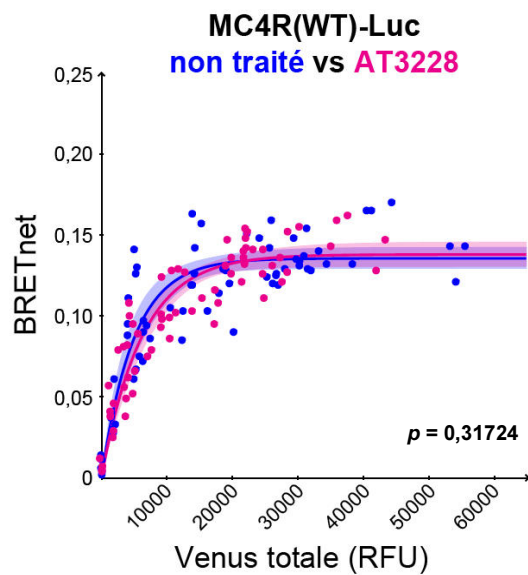
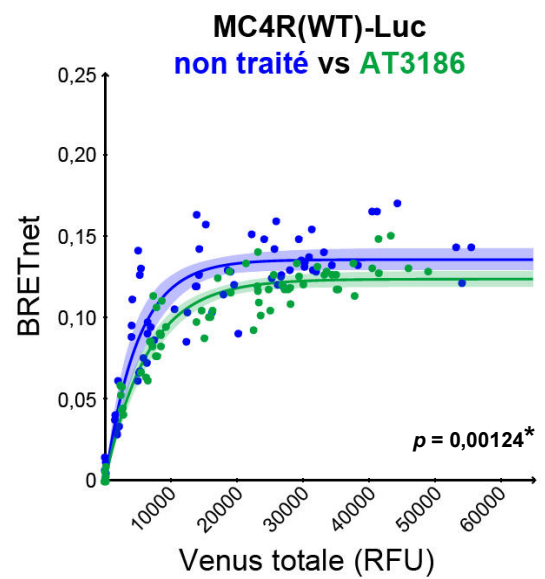
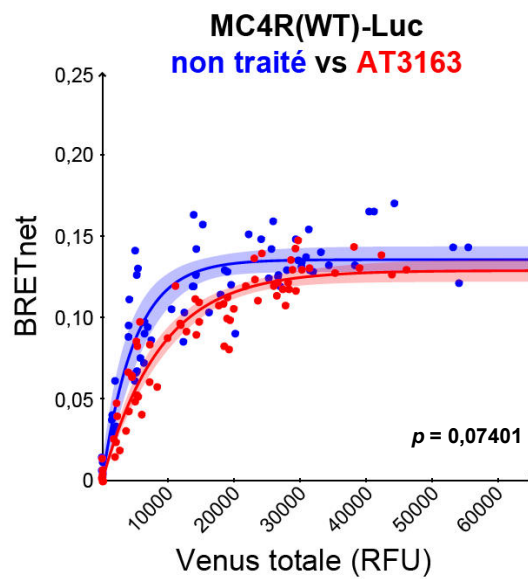
L'observation d'une hausse du BRETmax pour le mutant W164S (plus forte proximité avec la CNX) et la diminution de ce BRETmax (diminution de la proximité avec la CNX) subséquente à un traitement avec la CP **SR121463** sont consistantes avec la diminution du temps d'interaction entre le V2R(W164S) et la CNX suite au traitement avec le **SR121463** observée précédemment dans le laboratoire par une coimmunoprécipitation subséquente à un marquage métabolique (telle que décrite au début de la section 3.2.3).

A

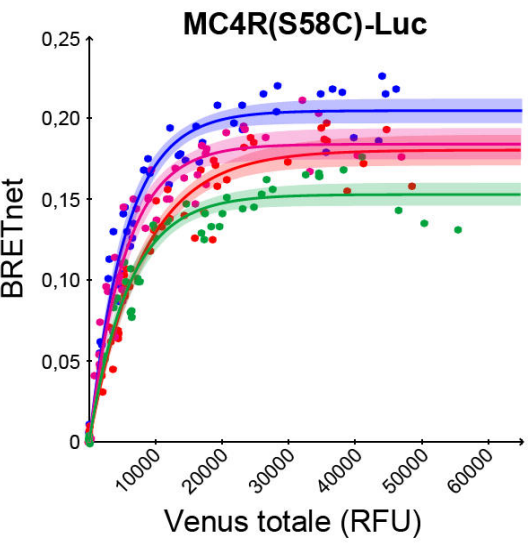
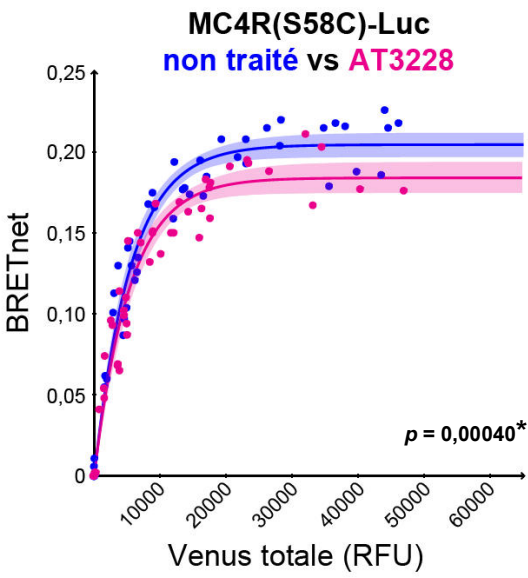
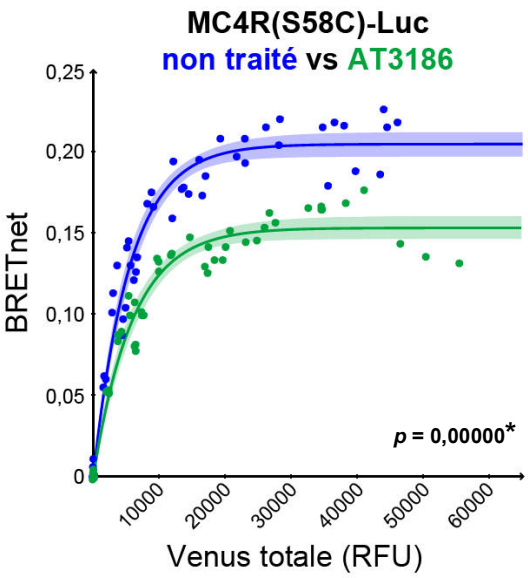
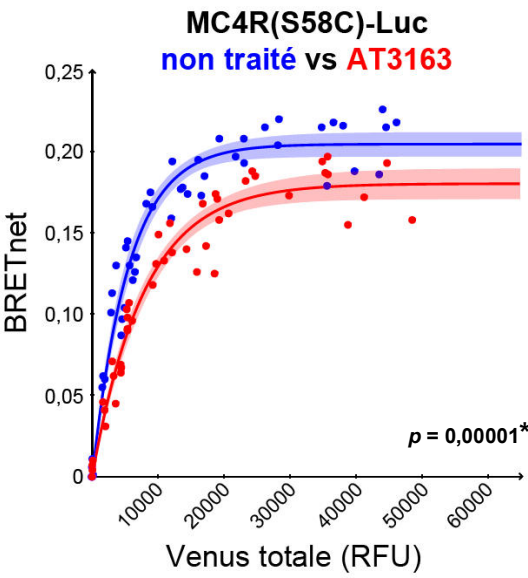


		non traité		SR121463	
		BRET max	Intervalle de confiance (95%)	BRET max	Intervalle de confiance (95%)
V2R	WT	0,081	0,070 à 0,098	0,044	0,039 à 0,052
	W164S	0,294	0,272 à 0,321	0,168	0,133 à 0,247

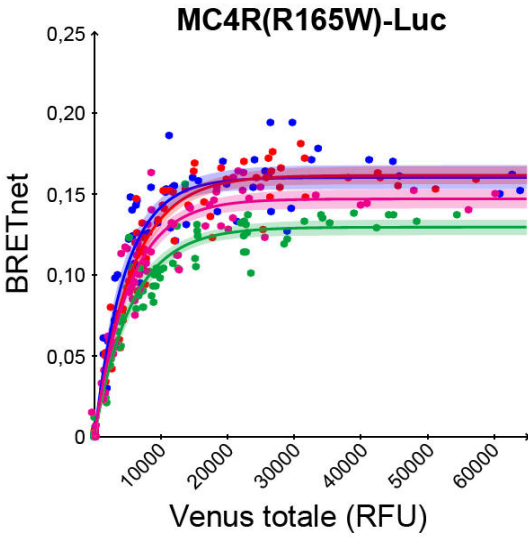
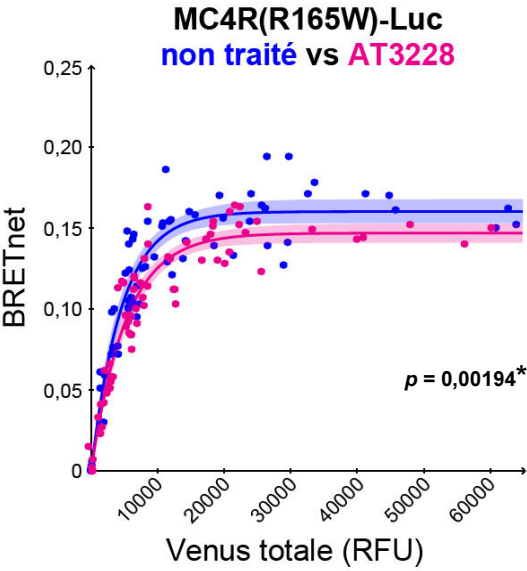
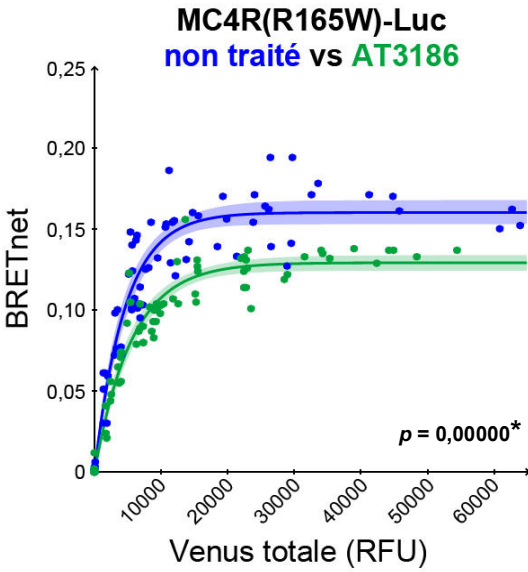
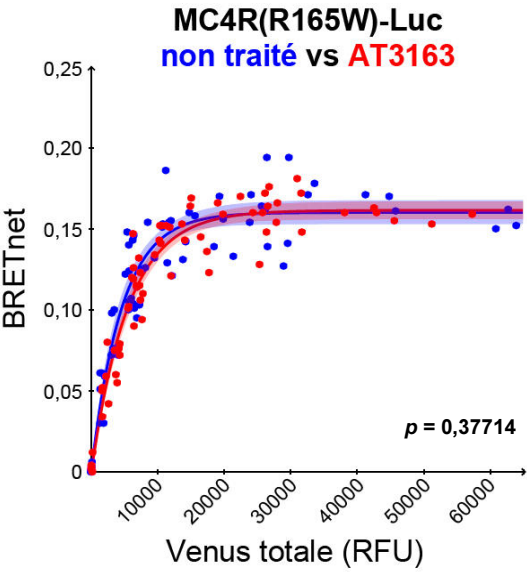
B1



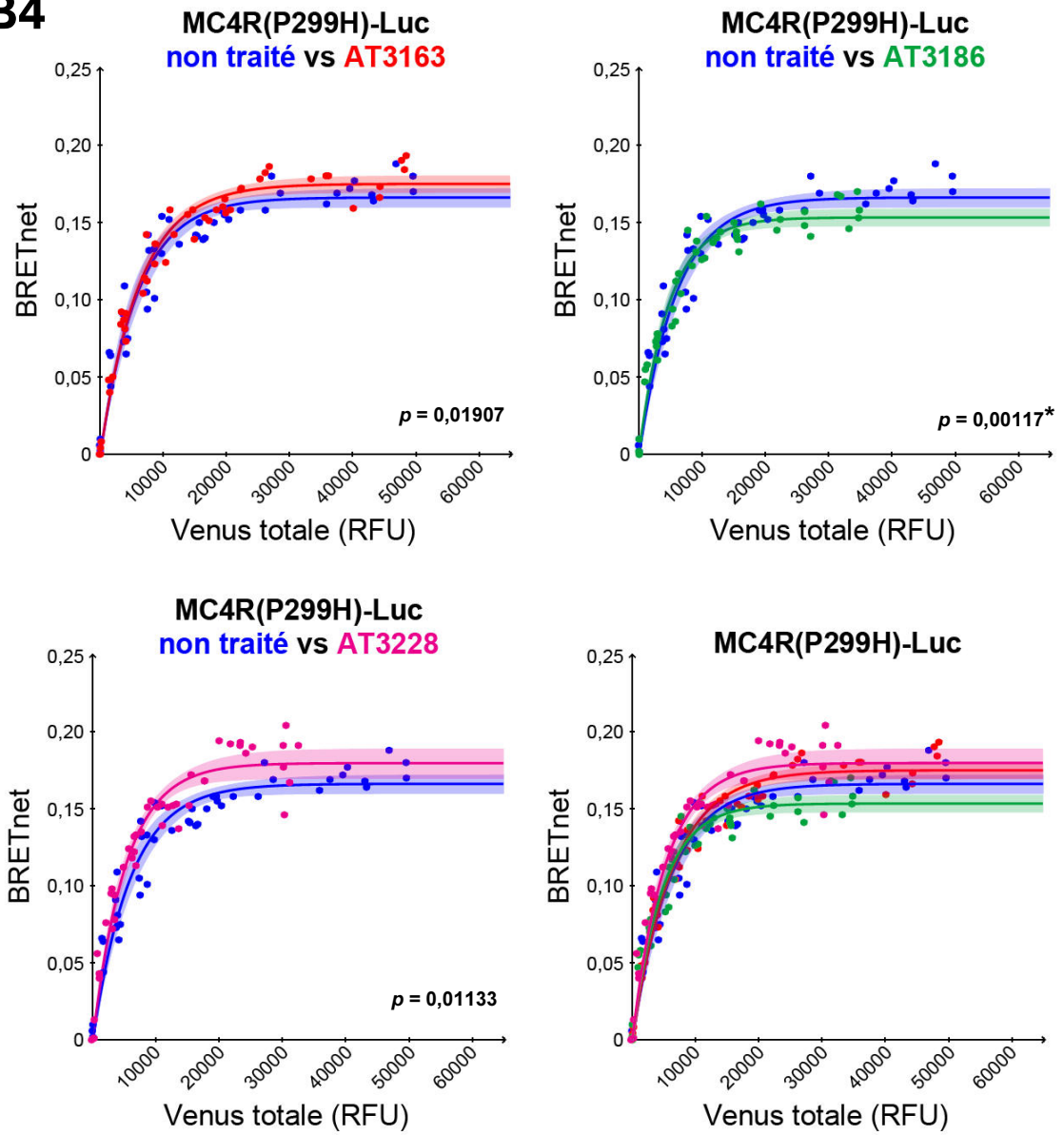
B2



B3



B4



B5

		non traité		AT3163		AT3186		AT3228	
		BRET max	Intervalle de confiance (95%)	BRET max	Intervalle de confiance (95%)	BRET max	Intervalle de confiance (95%)	BRET max	Intervalle de confiance (95%)
MC4R	WT	0,135	0,129 à 0,142	0,128	0,122 à 0,136	0,123	0,119 à 0,128	0,138	0,131 à 0,146
	S58C	0,205	0,197 à 0,212	0,180	0,171 à 0,190	0,153	0,146 à 0,160	0,184	0,175 à 0,193
	R165W	0,160	0,153 à 0,167	0,161	0,156 à 0,167	0,129	0,125 à 0,134	0,147	0,141 à 0,152
	P299H	0,166	0,160 à 0,172	0,175	0,169 à 0,180	0,153	0,148 à 0,159	0,180	0,170 à 0,188

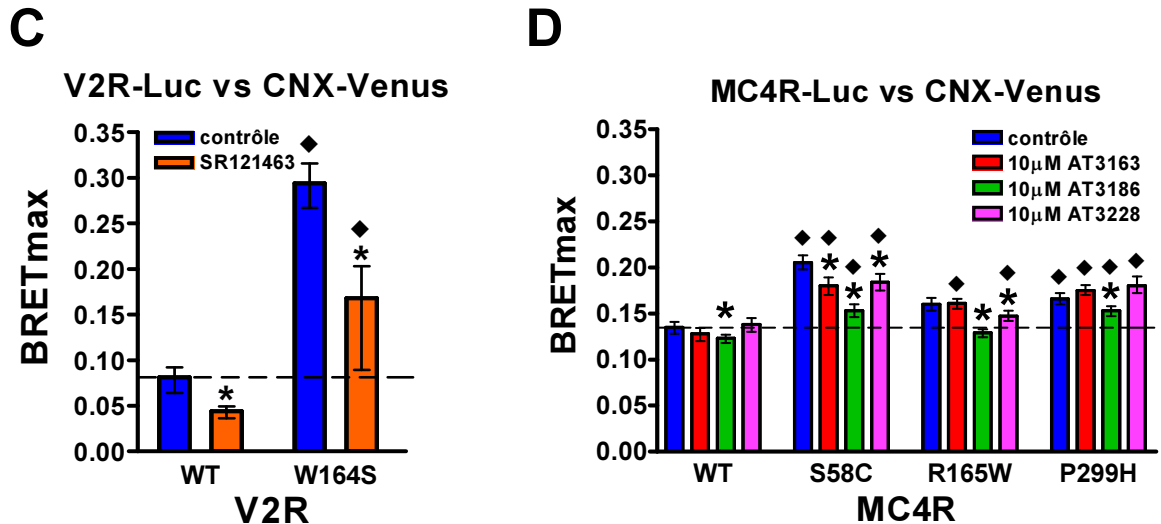


Figure 3.8. Essai de sortie de récepteurs du réticulum endoplasmique, suivant un traitement avec des chaperones pharmacologiques. Des cellules HEK293T ont été co-transfectées de manière transitoire avec soit (A) le V2R(WT)-Rluc ou V2R(W164S)-Rluc, ou (B) le 3HA-MC4R(WT)-Luc, 3HA-MC4R(S58C)-Luc, 3HA-MC4R(R165W)-Luc ou 3HA-MC4R(P299H)-Luc, conjointement à une quantité croissante de CNX-Venus. Les cellules ont été transférées à raison de 100 000 cellules par puits dans des plaques 96 puits 24 h après la transfection et ont été incubées en absence ou présence de 10 μ M **SR121463** pour le V2R, et de 10 μ M **AT3163**, **AT3186** ou **AT3228** pour le MC4R, pour 16 h. Le transfert d'énergie a été initié par l'addition de 5 μ M de coelenterazine H à chaque puits et le BRET a été mesuré dans le Multilabel Reader Mithras LB 940. Les valeurs de BRETnet ont été mises en graphe en fonction du niveau de l'expression totale de la protéine fluorescente Venus (**A1**) pour le V2R, **B1-4**) pour le MC4R). La même courbe contrôle (situation **non traité** des mutants respectifs) a été utilisée à chaque fois pour un même mutant à des fins de clarté (ne sont pas des contrôles indépendants). Les valeurs de BRETmax et leur intervalle de confiance respective sont énumérées dans les tableaux **A1**) pour le V2R et **B5**) pour le MC4R. Les zones de couleurs ombragées longeant les courbes représentent les intervalles de confiance à 95% générés par une analyse *bootstrap* dérivée de 10 000 ensembles de données provenant d'un test unilatéral par ré-échantillonnage. Les valeurs *p* sont indiquées sur chaque graphique paire par paire. Les valeurs *p* suivis d'un astérisque indiquent une différence significative entre les conditions indiquées (*, $p < 0,01$). Les histogrammes présentés en **C**) et **D**) représentent les BRETmax de chaque condition pour le **(C)** V2R et **(D)** le MC4R. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance à 95% (0,025-0,975). Les symboles représentent une différence significative issue de la comparaison entre les situations traité et non traité pour un même mutant (*, $p < 0,01$) ou de la comparaison avec le WT non traité (♦, $p < 0,01$). Les données de 2 ou 3 expériences indépendantes ont été rassemblées et analysées par régression non-linéaire en utilisant le programme Prism 3.0.

L'essai de BRET est donc validé par cette corroboration des résultats. L'action de la CP au niveau du réticulum endoplasmique est perceptible par cet essai de proximité, soit via la diminution de l'interaction directe avec la calnexine et/ou la diminution de collisions aléatoire par la sortie du récepteur du RE.

Nous avons donc transposé l'essai au MC4R afin de tester si le site de rétention du récepteur et le mode d'action des CP spécifiques au MC4R sont les mêmes (figure 3.8B et D).

La valeur de BRETmax du MC4R(WT)-Luc **non traité** est presque 2 fois plus élevée que celle du V2R(WT)-Luc (0,135 vs 0,081) pour des valeurs comparables de Luc et Venus, suggère une rétention 2 fois plus grande dans le RE pour le MC4R(WT) (figure 3.8B1). Étant donné le très petit ratio mature/immature vu en IP sur lysat total (figure 3.2A), ce résultat n'est pas étonnant. Ceci renforce l'hypothèse que le MC4R ait une plus faible cinétique de maturation que le V2R. Toutefois, les traitements avec les CP antagonistes ne semblent pas affecter le BRETmax (voir tableau de la figure 3.8), ce qui est plutôt surprenant étant donné la grande augmentation à la surface cellulaire induite par ces CP. Seul le composé **AT3186** semble favoriser la sortie du RE, car la valeur *p* entre le BRETmax du WT **non traité** et traité avec l'**AT3186** est inférieure à 0,01, donc significative. Cette diminution de BRET n'est toutefois pas très prononcée, si on compare avec le V2R.

Chez le MC4R(S58C)-Luc **non traité**, le BRETmax est un peu plus élevé (0,205), mais pas autant que le V2R(W164S)-Luc (0,294) (figure 3.8B2 et A). Les traitements avec les composés **AT3163**, **AT3186** et **AT3228** font diminuer le BRETmax de l'ordre de ~12%, ~25% et ~10%, respectivement. Chaque traitement donne un BRETmax plus faible que la situation **non traité**, et est statistiquement différent. Le S58C semble le plus retenu des mutants, malgré 40% d'expression à la surface cellulaire sans traitement. Tous les traitements induisent une diminution significative de la proximité avec la CNX, mais sont plutôt modestes à comparé aux variations observées chez le V2R(W164S). La CP la plus efficace à diminuer la proximité du S58C et de la CNX est bizarrement le composé agoniste, **AT3186**, qui a montré la plus faible restauration de l'expression à la surface cellulaire (figure 3.1A). Il ne faut toutefois pas oublier que la faible expression à la membrane plasmique observée pourrait être due à l'internalisation du MC4R subséquente

de la désensibilisation par cette CP agoniste. L'effet de l'**AT3186** est alors peut-être plus facilement perceptible au niveau du RE.

Le BRETmax du R165W **non traité** indique une proximité avec la CNX environ 22% plus faible que dans le cas du S58C **non traité**, avec une valeur de 0,160 (figure 3.8B3). Le S58C **non traité** est pourtant deux fois plus exprimé à la surface (figure 3.1A). Le BRETmax du R165W sans traitement est alors plus près de celui du WT **non traité** (différence de ~15%). Le traitement du R165W avec l'**AT3163** n'affecte pas le BRETmax (0,161), tandis qu'une légère diminution (~8%) est observée suite au traitement avec l'autre antagoniste, l'**AT3228** (0,147). L'agoniste **AT3186**, malgré une augmentation à la surface cellulaire du R165W du même ordre que l'**AT3163**, fait passer le BRETmax de 0,160 à 0,129, soit le fait diminuer d'environ 19%. Cette valeur rejoint le niveau du MC4R(WT) **non traité** (0,135) : la différence entre leurs BRETmax est non significative étant donné la valeur p supérieure à 0,01.

Le MC4R(R165W) étant deux fois moins exprimé à la surface cellulaire que le S58C, il était attendu que la rétention dans le RE (reflétée par le BRETmax) soit plus élevée que pour le S58C, ce qui n'est pas le cas. Il est surprenant de voir que malgré une expression à la surface cellulaire similaire entre le S58C et le R165W après le traitement avec l'**AT3163** (figure 3.1A), seul le S58C subit une baisse de BRETmax avec cette CP. La restauration de l'expression à la surface cellulaire du R165W avec les CP étant généralement similaire à celle du S58C (ou légèrement plus forte), une variation du même ordre dans la diminution de la proximité du mutant avec la CNX était attendue.

Le P299H **non traité** donne un BRETmax du même ordre que le R165W **non traité** (0,166) (figure 3.8B4), ce qui corrèle avec le fait que ces mutants sont tous deux exprimés au même pourcentage à la surface de la cellule (voir figure 3.1). Le traitement avec les antagonistes **AT3163** et **AT3228** ne font pas varier le BRETmax (0,175 et 0,180; valeurs $p > 0,01$), tandis que l'**AT3186** montre une légère diminution du BRETmax (0,153; valeur $p < 0,01$). Le MC4R(P299H)-Luc n'étant pas réchappé à la surface cellulaire par les composés antagonistes **AT3163** et **AT3228**, aucune variation majeure du BRETmax n'était attendue. Toutefois, l'**AT3186** réussit à baisser significativement le BRET pour le P299H : cette fois-ci, ceci corrèle avec l'augmentation de l'expression à la surface cellulaire par cette CP, contrairement au cas du MC4R(WT) traité avec la même CP.

Tous ces résultats suggèrent une action plus prononcée du composé agoniste sur la diminution de la proximité du MC4R avec la CNX. Toutefois, la capacité des CP à diminuer cette interaction, quoique souvent statistiquement significative, reste très modeste par rapport à celle du **SR121463** sur le V2R. Ceci est surprenant pour les mutants du MC4R car une augmentation marquée de l'expression à la surface cellulaire a été observée en cytométrie de flux (figure 3.1B).

Ces observations remettent en question l'hypothèse d'un site d'action des CP du MC4R au niveau du RE. En effet, il est possible que l'absence de variation majeure soit plutôt attribuée au fait que le site de rétention principal du MC4R soit en aval du RE, au niveau du Golgi. Si le pool de MC4R retenus dans le RE n'est pas la source principale des CP pour augmenter l'expression des récepteurs à la surface cellulaire, l'interaction avec la CNX ne sera pas affectée fortement. Ceci pourrait expliquer la faible variation de BRET entre les mutants et le WT **non traités**, et les conditions traité et non traité d'un même mutant.

En résumé, l'**AT3163** ne réussit à faire baisser significativement le BRETmax que du S58C seulement. L'**AT3186** est le plus apte à faire sortir le MC4R du RE, malgré la faible expression à la surface cellulaire observée à la figure 3.1A. Par contre, il ne faut pas oublier qu'il est probable que le gain d'expression à la surface soit diminué par une augmentation de la désensibilisation induisant l'internalisation du MC4R dû aux propriétés d'agoniste de ce composé. Finalement, l'**AT3228** réussit aussi à faire diminuer le BRETmax des mutants S58C et R165W, qui ont tous deux un fort rétablissement de l'expression à la membrane plasmique suite au traitement avec cette CP. Le BRETmax du WT n'est pas affecté par les CP antagonistes, mais une faible baisse est observée en présence de la CP agoniste **AT3186**.

Toutefois, malgré la réussite des CP à faire baisser significativement le BRETmax entre les mutants et la CNX, il faut garder en tête que les variations observées sont très modestes.

4. DISCUSSION

Au cours de la dernière décennie, il a été montré que la liaison de ligands lipophiles spécifiques au récepteur V2R augmente l'expression à la surface cellulaire des récepteurs mutants retenus à l'intérieur de la cellule et rattrape la fonctionnalité des récepteurs [102], et que ce concept fonctionne sur plusieurs autres RCPG [107-111]. Le principe de l'action de ces composés repose sur la liaison sélective du récepteur à l'endroit où ce dernier est retenu, i.e. à l'intérieur de la cellule. Cette interaction permet de stabiliser le récepteur dans une conformation favorable au surpassement du système de contrôle de qualité qui permet ainsi le rétablissement de son expression à la surface cellulaire. Ces composés, par leur spécificité au récepteur et par leur action se rapprochant de celle des protéines chaperons du RE, ont été nommés chaperones pharmacologiques [89].

Le principe de chaperone pharmacologique comme traitement du diabète insipide néphrogénique (DIN) ayant été un succès clinique pour le V2R, le but de la présente étude était de trouver des molécules spécifiques aptes à réaliser le même effet pour le MC4R, afin de traiter l'obésité morbide précoce (OMP).

Nous avons montré que les composés **AT3163**, **AT3186** et **AT3228**, en restaurant l'expression à la membrane plasmique et la fonctionnalité des formes mutantes S58C et R165W du MC4R, agissent à titre de chaperones pharmacologiques (CP). De manière surprenante, les CP ont aussi eu un grand effet sur le récepteur sauvage (WT). Les hypothèses soulevées pour expliquer ce phénomène sont soit le manque d'une protéine accessoire nécessaire à la maturation du MC4R dans le système hétérologue utilisé (HEK293T), soit le MC4R est, de manière intrinsèque à ce récepteur, mal replié. Une cinétique de maturation lente du MC4R a été proposée.

La propriété de ligand des CP semble être d'importance dans le niveau de réponse des mutants. Une moindre restauration de l'expression à la surface cellulaire et de la fonctionnalité des mutants par la CP agoniste **AT3186** par rapport aux CP antagonistes a été notée. Toutefois, il est possible qu'un gain supérieur en expression à la surface cellulaire ait été masqué par l'internalisation subséquente à une désensibilisation par le composé agoniste.

En général, il a été observé que différentes CP ont des effets distincts sur le rétablissement à la surface cellulaire et la fonctionnalité selon le mutant traité, et qu'inversement, les différents mutants traités ont des réponses distinctes selon la CP utilisée. Il est suggéré que les différentes CP puissent stabiliser des conformations distinctes du mutant qui sera plus ou moins réchappé à la membrane plasmique, plus ou moins apte à signaler et plus ou moins apte à désensibiliser.

Tout d'abord, les différentes conformations adoptées pourraient en effet être traitées différemment par le système de contrôle de qualité, affectant ainsi le rétablissement de l'expression à la surface cellulaire. Ensuite, la forte stabilisation d'une conformation inactive du mutant par la CP pourrait entraver la signalisation du récepteur et inversement, la stabilisation d'une conformation active pourrait faciliter la signalisation. Finalement, la stabilisation d'une conformation plus ou moins favorable à la phosphorylation par les GRK favoriserait ou préviendrait la désensibilisation du récepteur.

Dans une autre perspective, les propriétés du mutant lui-même pourrait affecter la restauration à la surface cellulaire et la fonctionnalité. Une mutation causant un repliement plus (ou moins) éloigné de la conformation native pourrait faire en sorte que la stabilisation d'une conformation favorable à la dissociation du système de contrôle de qualité par les CP soit moins (ou plus) efficace. La mutation pourrait aussi entraver ou améliorer la liaison des ligands classiques (α -MSH, NDP- α -MSH), à la liaison de la CP elle-même, ou encore au couplage à la protéine G, ce qui aurait un effet sur la signalisation.

Nous avons commencé à explorer le mécanisme d'action des CP du MC4R. Nous avons remarqué que la maturation du MC4R semble être très lente, étant donné l'absence de forme de plus haute masse moléculaire correspondant à une forme mature sur les IP du lysat total (Figure 3.2B), mais qu'il est possible de détecter une forme mature par une IP de surface (Figure 3.4). Un effet sur la maturation est suggéré par l'apparition de forme mature à la surface suite au traitement avec les diverses CP (figure 3.5). Contrairement au V2R, les CP du MC4R ne semblent pas agir principalement au niveau du RE, étant donné l'effet modeste des CP sur la diminution du BRETmax entre le MC4R-Luc et la CNX-Venus. Un site de rétention principal du MC4R dans le Golgi a alors été proposé pour expliquer ces observations.

Au cours de la section discussion, nous aborderons ces divers sujets.

4.1 Identification de chaperones pharmacologiques pour le MC4R

Les composés **AT3163**, **AT3186** et **AT3228**, en rétablissant l'expression à la surface cellulaire et la fonctionnalité des mutant S58C et R165W, agissent en tant que chaperones pharmacologiques (figure 3.1). Les effets de chaque CP sont toutefois variables d'un mutant à l'autre : autant une CP peut avoir des effets différents selon le mutant utilisé, autant le mutant peut réagir différemment selon la CP utilisée.

Une partie des effets perçus pourraient être attribuables à la différence d'affinité des CP pour les différents mutants. Effectivement, les affinités présentées au tableau IV sont celles pour le récepteur de type sauvage (WT). Ces valeurs ne peuvent être transposées aux mutants, car la mutation qui afflige le récepteur, quoique n'entravant pas la liaison du NDP- α -MSH (selon les critères de sélection des mutants, section 1.5.3, p.29), pourrait toutefois faire varier l'affinité pour ce ligand et pour les CP.

Dans les sections qui suivent, nous discuterons de l'effet des CP sur les mutants du MC4R. Or, une des observations frappantes de ce mémoire est l'effet des CP sur le WT. Comme ce phénomène inattendu a suscité notre intérêt, nous commencerons par discuter de l'effet des CP sur le WT.

4.1.1 Le MC4R(WT)

4.1.1.1 Effet des CP sur l'expression à la surface cellulaire du MC4R(WT)

4.1.1.1.1 Les CP antagonistes

Contrairement à ce qui a été observé dans le cas du V2R, où un traitement avec le **SR121463** n'augmentait que très peu l'expression à la surface cellulaire du V2R(WT) (~10% - voir figure 7.2, annexe), le traitement du récepteur MC4R(WT) avec les composés antagonistes **AT3163** et **AT3228** augmente significativement l'expression à la membrane plasmique de ce récepteur sauvage. Cet effet pourrait être causé par le rétablissement à la surface cellulaire du MC4R(WT) constitutivement instable (et ainsi largement retenu dans le RE) par l'adoption d'une conformation favorable à la dissociation du système de contrôle de qualité, induite par la liaison de la CP.

Afin de montrer que le gain d'expression à la surface cellulaire est principalement dû à l'action des CP sur le pool de MC4R(WT) intracellulaire, un essai d'arrêt de l'internalisation par un antagoniste imperméable à la membrane cellulaire pourrait être exécuté. Le traitement chronique avec l'antagoniste peptidique SHU9119 devrait augmenter l'expression à la surface cellulaire du MC4R en bloquant l'internalisation [123]. Le SHU9119 étant incapable de pénétrer dans la cellule, il ne peut avoir d'effet sur la population intracellulaire de MC4R. Un gain supplémentaire de l'expression à la surface cellulaire suite au traitement combiné du SHU9119 avec les différentes CP du MC4R permettra de confirmer que l'augmentation de l'expression à la membrane plasmique perçue suite au traitement avec les CP ne provient pas seulement de la stabilisation du récepteur à la surface cellulaire et du recyclage de récepteurs internalisés, mais aussi (et peut-être surtout) de l'arrivée de récepteurs intracellulaires assistés par les CP.

Nous avons tenté de montrer l'instabilité du MC4R(WT) par un marquage métabolique suivi de chasses de différents temps. Le marquage métabolique permet normalement de suivre la maturation de néo-récepteurs sur SDS-PAGE dans le temps par l'incorporation de méthionine et cystéine radiomarquées au ^{35}S . Suite à des chasses (arrêt de l'incubation des cellules dans le milieu de marquage et ajout d'un surplus de méthionine et cystéine froides) de différentes périodes de temps, la maturation du néo-récepteur radiomarké dans le temps peut être suivie par fractionnement sur SDS-PAGE par la variation de la masse moléculaire apparente du récepteur. Cet essai a été tenté sur le MC4R(WT), mais n'a été réussi qu'une seule fois, et avec un signal plutôt discret (voir figure 7.3, annexe). À première vue, la faible présence de récepteur immature sans apparition proportionnelle de récepteur mature dans le temps suggère une cinétique de maturation lente du MC4R à comparé au V2R (figure 7.3B), tel que proposé suite aux IP du lysat total et IP de surface (figures 3.2 et 3.5). Toutefois, les conditions devront être optimisées avant de pouvoir tirer une conclusion claire sur la maturation du récepteur.

Une autre possibilité pour expliquer l'augmentation de l'expression à la surface cellulaire du MC4R(WT) suite aux différents traitements est l'augmentation de la demi-vie du récepteur à la membrane plasmique consécutive d'une diminution de l'internalisation constitutive. Un essai d'internalisation suivi par ELISA pourrait être exécuté pour répondre à cette hypothèse. En effet, il est possible de suivre le niveau d'internalisation du récepteur en faisant un marquage par biotinylation des récepteurs (étiquetés adéquatement pour permettre la biotinylation) à la surface cellulaire sur des cellules

entières [124]. Le marquage avec la biotine permet de suivre la population de récepteurs présents à la surface à un temps « X » et permet ainsi de ne pas avoir à tenir compte des néo-récepteurs provenant du Golgi. Une fois les récepteurs marqués, le suivi de leur internalisation avec et sans CP peut être réalisé. Une augmentation de la demi-vie du récepteur à la surface cellulaire suite aux traitements confirmerait cette hypothèse. Il est toutefois possible que les récepteurs internalisés soient recyclés vers la surface cellulaire, ce qui pourrait affecter à la hausse la valeur de la demi-vie calculée : il faut considérer cet effet possible dans l'interprétation des résultats.

Comme l'internalisation du MC4R se fait d'une manière dépendante de la β -arrestine et de la dynamine [10, 125], la surexpression du mutant dominant négatif dynamine K44A [126] pourrait être utilisée comme contrôle négatif d'internalisation.

4.1.1.1.2 Les CP agonistes

Quant à la CP agoniste **AT3186**, aucun effet sur l'augmentation de l'expression relative à la surface cellulaire n'a été observé pour le MC4R(WT). Un gain est peut-être survenu, mais est imperceptible dû à l'internalisation du récepteur subséquente à la désensibilisation induite par la CP agoniste. Un essai d'arrêt de l'internalisation par un antagoniste peptidique tel que proposé précédemment pour les CP antagonistes pourrait être réalisé afin de révéler ce gain potentiel. La présence d'antagoniste peptidique SHU9119 (imperméable à la membrane) en excès par rapport à la CP agoniste permettra de prévenir la désensibilisation et l'internalisation des récepteurs réchappés à la surface cellulaire par l'**AT3186**. En effet, le SHU9119 ayant une affinité plus de 10 fois plus forte pour le MC4R que l'**AT3186**, (0,3 nM pour le SHU9119 [123] et 5,6 nM pour l'**AT3186**, voir au tableau IV au début de la section 3) et étant présent à une plus forte concentration, cet antagoniste permettra le déplacement de la CP du site de liaison du récepteur. L'essai du suivi de l'internalisation par biotinylation tel que déjà proposé pourrait ensuite être réalisé pour connaître la demi-vie du récepteur à la surface cellulaire.

4.1.1.2 Effet des CP sur la production d'AMPc du MC4R(WT)

4.1.1.2.1 Les CP antagonistes

Un fait intéressant est que l'**AT3163** et l'**AT3228**, en faisant augmenter l'expression à la surface cellulaire du MC4R(WT) de ~35% et ~60% respectivement, font augmenter l'accumulation d'AMPc d'environ 2 fois et 3 fois par rapport à la situation **non traité**. Donc, pour une même expression à la surface cellulaire, les CP semblent donner environ 1,5 et 1,9 fois plus d'activité, respectivement. Il est possible que cette augmentation de l'efficacité de signalisation soit attribuée à une augmentation de l'affinité pour le NDP- α -MSH ou à une augmentation de l'efficacité de couplage à la protéine G par la stabilisation de conformations favorables à ces phénomènes par les CP antagonistes.

La plus grande efficacité de l'**AT3228** à rétablir l'expression à la surface cellulaire et la fonctionnalité par rapport au composé **AT3163** pourrait être attribuée à la plus grande affinité de ce composé pour le MC4R(WT) : la force d'interaction est plus intense et peut ainsi stabiliser de manière plus efficace une certaine conformation, qui est, dans ce cas-ci, favorable au trafic vers la membrane plasmique et à la signalisation.

En considérant que le MC4R(WT) est constitutivement instable par rapport au V2R(WT), il pourrait être supposé que les traitements avec les CP antagonistes augmentent l'affinité relative du MC4R(WT) pour le NDP- α -MSH. En effet, l'affinité pour le NDP- α -MSH pourrait être augmentée par les CP en stabilisant une conformation du récepteur plus près de la forme active qu'à l'état **non traité** et/ou en favorisant la stabilité de la cavité de liaison (*binding pocket*). Cette hypothèse pourrait être vérifiée par un essai de saturation du MC4R à la surface cellulaire par le radioligand I^{125} -NDP- α -MSH. Suite à un traitement chronique avec les CP, des lavages permettront de déloger les CP liées aux récepteurs présents à la membrane plasmique pour libérer les sites de liaison possibles du I^{125} -NDP- α -MSH. Une diminution du K_d indiquerait une augmentation de l'affinité pour le MC4R(WT).

Si l'affinité pour le NDP- α -MSH n'est pas affectée, il se pourrait que la plus forte réponse au NDP- α -MSH observée après les traitements avec les CP antagonistes soit provoquée par une augmentation de l'efficacité de couplage à la protéine G. Un essai d'interaction protéine-protéine suivi par BRET pourrait être fait entre le MC4R et la protéine G_s suite à

un traitement avec les CP. Une courbe de saturation du MC4R-Luc par la protéine G_s-Venus permettrait de suivre l'interaction des deux partenaires suite au traitement. Une augmentation de leur affinité relative (représentée par le BRET50, soit la valeur associée à la quantité de protéine G_s-Venus nécessaire pour atteindre la moitié du BRETmax [122]) serait détectée par une diminution du BRET50.

Par contre, cet essai ne permet pas de connaître la source de la hausse de l'affinité pour la protéine G. L'**AT3163** et l'**AT3228** pourraient favoriser l'adoption d'une conformation du récepteur pour laquelle 1) la protéine G a une plus grande affinité ou 2) la désensibilisation est diminuée (sites de phosphorylation difficilement accessible par la GRK).

Un essai du suivi de la désensibilisation permettra de vérifier la 2e hypothèse. La désensibilisation peut être mesurée par la diminution de la réponse du récepteur au NDP- α -MSH (en terme d'accumulation d'AMPc) suite à des stimulations consécutives avec cet agoniste. La stimulation des RCPG par un ligand agoniste provoquant la désensibilisation, une deuxième stimulation des mêmes cellules devrait générer une moins grande accumulation d'AMPc. Si le traitement avec les CP antagonistes diminue la désensibilisation des RCPG, l'accumulation d'AMPc suite à la deuxième stimulation avec le NDP- α -MSH devrait être supérieure que dans le cas **non traité**.

Si la désensibilisation est effectivement diminuée, il serait intéressant d'en connaître le mécanisme d'action. Il a été montré que le MC4R est internalisé d'une manière dépendante des β -arrestines 1 et 2 [10, 125]. Ces protéines sont aussi impliquées dans le phénomène de désensibilisation [127]. En effet, leur recrutement aux récepteurs phosphorylés par des kinases de RCPG (GRK2 pour le MC4R) provoque l'arrêt de la signalisation par le découplage des protéines G hétérotrimériques du récepteur et cible les RCPG pour l'internalisation dans des vésicules tapissées de clathrine [128]. Un suivi de l'interaction par le BRET entre le MC4R et les β -arrestines en présence ou absence de traitement pourrait être instructif quant au taux de désensibilisation du récepteur.

4.1.1.2.2 La CP agoniste

Pour ce qui est du composé agoniste **AT3186**, il n'affecte pas l'expression à la surface cellulaire du MC4R(WT), mais fait diminuer l'accumulation d'AMPc suite à la stimulation avec le NDP- α -MSH. En effet, le WT connaît une baisse de l'ordre de ~20%

d'accumulation d'AMPc par rapport à la situation **non traité**, malgré un niveau d'expression à la surface cellulaire similaire. Ce phénomène peut possiblement être attribué au fait que l'**AT3186** soit un agoniste : la stimulation du récepteur par la chaperone pharmacologique elle-même peut mener à la désensibilisation et l'internalisation du RCPG, ainsi, à la diminution d'accumulation d'AMPc suite à la stimulation par le NDP- α -MSH. L'essai du suivi de la désensibilisation par une double stimulation tel que déjà proposé pourrait être réalisé pour répondre à la question. L'essai de suivi de l'interaction avec les β -arrestines proposées pour les CP antagonistes s'appliquent donc aussi à la CP agoniste. Cette expérience permettrait de connaître le taux de désensibilisation du récepteur traité avec l'**AT3186**.

La CP agoniste pourrait aussi augmenter l'expression à la surface cellulaire du récepteur tout en augmentant l'internalisation, ce qui aboutirait à un même nombre de récepteur à la membrane à l'équilibre. Le temps de résidence du récepteur serait toutefois diminué, ce qui diminuerait les probabilités d'interaction avec la protéine G, résultant en une plus faible accumulation d'AMPc pour une même quantité de récepteur à la surface.

Pour connaître les propriétés de désensibilisation de l'**AT3186** lui-même (en tant qu'agoniste), les essais proposés (double stimulation et interaction avec les β -arrestines) pourraient être fait en prenant cette fois-ci l'**AT3186** comme ligand agoniste plutôt que comme CP. Dans les deux cas, le récepteur serait préalablement traité avec une CP antagoniste pour rétablir le récepteur à la surface cellulaire sans causer de désensibilisation. La CP antagoniste serait ensuite lavée pour permettre la stimulation aiguë des récepteurs avec la CP agoniste **AT3186**. Ceci permettrait de connaître la part de l'**AT3186** dans la désensibilisation du MC4R et pourrait être comparée à celle engendrée par la stimulation par le NDP- α -MSH.

La présence à la surface cellulaire du MC4R(WT) à 100% et l'accumulation d'AMPc à 80% de la normale pour l'**AT3186** pourrait aussi être expliquée par une baisse de l'affinité avec la protéine G. L'essai BRET d'interaction entre le récepteur et la protéine G suivant le traitement avec l'**AT3186**, tel que proposé pour les CP antagonistes, donnerait l'information nécessaire pour éliminer ou confirmer cette option. S'il est bien question d'une diminution de l'affinité pour la protéine G, il est possible que, contrairement au CP antagonistes, la CP agoniste ait un effet sur le récepteur MC4R(WT) en induisant soit une conformation défavorable au couplage soit une conformation favorisant la désensibilisation

(indépendante de l'activation du récepteur). Alors que la première option est plutôt contre-intuitive, puisqu'un agoniste favorise habituellement la signalisation, un essai de double stimulation avec le NDP- α -MSH tel que déjà discuté permettrait de valider la 2^e hypothèse.

Afin d'aider à discerner les différences du mode d'action des CP agoniste et antagonistes, les diverses expériences proposées devront être réalisées pour les mutants aussi.

4.1.2 Le MC4R(S58C)

En fonction de l'expression à la surface cellulaire du S58C (sans traitement) et de l'accumulation d'AMPc suite à une stimulation avec le NDP- α -MSH observés, il peut être présumé que le S58C **non traité** ne réussisse pas à adopter une conformation favorable à la signalisation. En effet, la très faible accumulation d'AMPc (<5%) malgré sa présence à la surface cellulaire à 40% du niveau du WT appuie cette hypothèse (figure 3.1A, barres bleues). Après le traitement du S58C avec l'**AT3163**, l'accumulation d'AMPc (~100%) est proportionnelle à l'expression à la surface cellulaire (~100%). Le même phénomène de proportionnalité se produit avec les autres CP. Les différentes CP ont alors vraisemblablement un effet sur la stabilisation d'une structure fonctionnelle du récepteur, par opposition à la restauration de la fonctionnalité par le simple rétablissement à la surface du mutant retenu dont la structure permettrait de signaler (sans stabilisation par la CP).

Malgré le fait que la proportionnalité entre l'expression relative à la surface cellulaire et l'accumulation d'AMPc stimulée par le NDP- α -MSH soit respectée, l'**AT3186** n'engendre pas une expression à la surface cellulaire au niveau du WT **non traité** (soit 100%). Reste à voir si la plus faible expression à la membrane plasmique est causée par l'internalisation induite par la CP agoniste, par un essai d'arrêt de l'internalisation par une antagoniste peptidique tel que proposé précédemment (section 4.1.1.1.2).

Le fait que le rétablissement de l'expression à la membrane plasmique et de la fonctionnalité soient sous la barre du 100% n'élimine pas ce composé comme CP potentielle. Un gain de ~60% de la fonctionnalité pourrait quand même aider les patients atteint de la maladie d'obésité morbide précoce causée par la rétention du MC4R. Les propriétés agonistes de l'**AT3186** pourraient avoir un effet à plus court terme que le

traitement de 16h effectué dans cet essai. Il faudrait alors étudier l'effet de cette CP à des temps d'incubation plus courts.

L'**AT3228**, de son côté, ne favorise pas une augmentation de l'AMPc proportionnelle à son expression à la surface cellulaire, qui est plutôt proportionnellement plus faible. Deux options sont possibles : soit que l'**AT3228** ne rétablit pas totalement la fonctionnalité en favorisant une conformation moins active que le WT, soit que l'**AT3228** est trop affin pour le récepteur et qu'il est difficile à déplacer par le ligand naturel.

En regardant ce qui se produit pour le WT, la 2^e option perd de la crédibilité : l'accumulation d'AMPc est supérieure à l'expression à la surface cellulaire (figure 3.1A). Toutefois, on ne peut écarter la possibilité que les mutants aient une plus grande affinité pour l'**AT3228** que le WT. Un essai de saturation des différentes CP radiomarquées sur les différents mutants permettra de connaître l'affinité des CP pour chaque mutant. Le choix et l'emplacement de l'isotope sur les CP sera important, car un trop gros atome et/ou son mauvais emplacement pourrait entraver la liaison de la CP radiomarquée. En cas d'échec du marquage des CP, il faudrait considérer faire l'essai de déplacement du radioligand I¹²⁵-NDP- α -MSH radioactif par les CP, mais ceci implique le biais que les CP sont compétitives pour le NDP- α -MSH. Les composés ayant été élaborés selon la structure de ligands du MC4R, le site de liaison prédit est le même que pour le NDP- α -MSH, mais cela n'a pas été prouvé. De plus, le NDP- α -MSH n'étant pas perméable aux différentes membranes, il faudrait rétablir l'expression à la surface par les CP préalablement à l'essai. Des lavages stringents s'imposent alors pour empêcher les CP d'entrer en compétition avec le NDP- α -MSH. Cet essai, rappelons-le, n'est qu'une alternative si le marquage des CP elle-même ne fonctionne pas.

Quant à l'option de l'adoption d'une conformation moins facilement activable pour expliquer l'accumulation d'AMPc proportionnellement plus faible que le niveau d'expression relative à la surface à la surface cellulaire pour le S58C après le traitement avec l'**AT3228**, elle comporte plusieurs volets. Par conformation moins active, on entend soit une baisse de l'affinité pour la protéine G, soit la baisse de l'affinité au NDP- α -MSH suite au traitement. Dans le cas de la 2^e option, il est possible que l'**AT3228** ne parvienne pas à stabiliser la cavité de liaison pour le NDP- α -MSH de façon optimale. Ceci pourrait résulter en une baisse de l'affinité pour le ligand et ainsi une baisse de la production d'AMPc subséquente. Un essai de saturation du récepteur par le radioligand I¹²⁵-NDP- α -

MSH tel que décrit précédemment (section 4.1.1.2.1) pourra éclaircir la question. Pour ce qui est de l'hypothèse de la perte d'affinité pour la protéine G, elle pourra encore une fois être vérifiée par le suivi de l'interaction entre le récepteur et la protéine G par BRET.

En résumé, ces observations nous mènent à conclure que pour le S58C, le simple rétablissement de l'expression à la surface cellulaire n'est pas suffisant pour recouvrer la fonctionnalité. Ce mutant a besoin d'aide à se replier pour pouvoir être fonctionnel. La formation de la cavité de liaison, est peut-être plus difficile à adopter pour le S58C que pour les autres variantes du MC4R. Aussi, il est possible que la capacité de couplage à la protéine G soit affectée. Ceci pourrait potentiellement expliquer pourquoi ce mutant semble être plus « réfractaire » aux traitements avec les antagonistes que le WT.

4.1.3 Le MC4R(R165W)

Le composé **AT3163**, bien qu'il réchappe le R165W à la surface au même niveau que le WT **non traité** et du S58C traité avec l'**AT3163**, montre un niveau d'accumulation d'AMPc trois fois plus fort que dans ces deux conditions. Ceci laisse entrevoir la possibilité que la mutation R165W procure un gain de fonction au MC4R muté lorsque celui-ci atteint la surface cellulaire. En effet, le traitement du WT avec l'**AT3163** ne fait que doubler l'accumulation d'AMPc du WT **non traité**.

Toutefois, le traitement du R165W avec l'**AT3186** et l'**AT3228** ne montre pas le même effet. Le pourcentage d'accumulation d'AMPc est proportionnel à l'expression à la surface cellulaire. Le gain de fonction supposé au paragraphe précédent reste plausible, dans l'optique où les composés **AT3186** et **AT3228** ne permettraient pas de le mettre en valeur.

Tel que déjà proposé, il est possible que l'**AT3186** fasse diminuer l'accumulation d'AMPc au temps de lecture à cause de la désensibilisation associée à ses propriétés agonistes. Ceci pourra être vérifié par les essais de suivi de la désensibilisation déjà proposés (double stimulation et suivi de l'interaction avec les β -arrestines).

Quant à l'**AT3228**, malgré un rétablissement du R165W à la surface cellulaire ~2,5 fois plus grand qu'avec l'**AT3163**, l'**AT3228** montre un même niveau d'activation de l'adénylate cyclase stimulée par la NDP- α -MSH. Ce phénomène pourrait être expliqué par trois

hypothèses. Premièrement, il est possible que l'**AT3228** soit trop affin pour le R165W et qu'il limite le gain de fonction vu avec l'**AT3163**, en empêchant le NDP- α -MSH de se lier au récepteur. Deuxièmement, l'**AT3163** pourrait être est le seul à pouvoir donner ce gain de fonction et l'**AT3228** pourrait rétablir tout simplement une fonctionnalité du même ordre que le WT **non traité**. En effet, tel que discuté à la fin de la section 3.1 (p.52), les différentes propriétés des CP (structure du composé et affinité pour les MC4R) peuvent potentiellement induire des conformations distinctes chez le même mutant, qui sont dotées d'une efficacité de signalisation différente. Finalement, il est possible que la quantité de protéine G exprimée de manière endogène ne soit pas suffisante pour saturer la grande quantité de récepteurs réchappés à la surface (récepteurs de réserve). Un contrôle positif de stimulation maximale de l'adénylate cyclase par la forskoline a confirmé que cet effet n'est pas dû à une saturation de la voie de signalisation (résultats non montrés).

Si l'**AT3228** est trop affin pour le R165W, il est possible que la CP soit mal déplacée par le NDP- α -MSH, causant ainsi une augmentation d'AMPc moins élevée qu'elle ne devrait l'être. Si ce n'est pas le cas, l'**AT3228** réussit alors à rétablir la fonctionnalité de manière proportionnelle à l'expression à la surface cellulaire, et c'est plutôt l'**AT3163** qui procure un gain de fonction à ce mutant. En connaissant l'affinité des CP pour le R165W par un essai de saturation du MC4R par des CP radiomarquées tel que décrit précédemment (section 4.1.2.), l'hypothèse de la trop forte affinité de l'**AT3228** pourra être confirmée ou éliminée.

Pour ce qui est de la deuxième option, soit une différence de conformation induite par les CP **AT3228** et **AT3163** menant à différentes efficacités de signalisation, l'observation que le R165W traité avec l'**AT3228** soit deux fois moins efficace que le WT traité avec la même CP appuie l'hypothèse énoncée (figure 3.1). Aussi, pour l'**AT3163**, le R165W était moins exprimé à la surface cellulaire, mais produisait plus d'AMPc que le WT traité avec la même CP. Les essais de suivi de la désensibilisation par la double stimulation du récepteur et par le BRET entre le récepteur vs β -arrestine, ainsi que le suivi de l'interaction entre le récepteur et la protéine G par le BRET tels que décrit précédemment pourront préciser la nature de cette différence d'efficacité de signalisation.

Pour vérifier que l'accumulation d'AMPc n'est pas limitée par le manque de protéine G pour interagir avec la grande quantité de récepteurs réchappés à la surface, la surexpression de la protéine G_s conjointe à celle du R165W pourrait être réalisée. Si le signal est augmenté, l'hypothèse des récepteurs de réserve sera démontrée.

4.1.4 Le MC4R(P299H)

Le fait que le mutant P299H ne soit même pas réchappé à la surface cellulaire par les CP antagonistes suggère que cette mutation confère une plus grande restriction conformationnelle au récepteur, l'empêchant de surpasser le système de contrôle de qualité malgré l'aide des CP. Il se pourrait que le MC4R se comporte comme le β_2 AR, qui a été montré comme devant être assemblé avec sa protéine G dans le RE/ERGIC afin de pouvoir être acheminé à la surface cellulaire [129]. La présence de la mutation dans le site consensus N/DP**299**XXY, qui est important dans l'activation des RCPG [5, 7, 8], pourrait compromettre l'interaction entre le récepteur et la protéine G et ainsi retenir le récepteur dans le RE. Dans ce cas, l'assemblage avec les sous-unités de la protéine G pourraient potentiellement permettre de masquer des séquences de rétention ou des régions hydrophobes qui mèneraient autrement à la rétention du récepteur [129], ou encore, pourrait contribuer à son bon repliement. Aussi, il est supposé que les CP lient les récepteurs de par leur propriété de ligand spécifique au MC4R, mais il est possible que les CP antagonistes n'arrivent tout simplement pas à lier le P299H. Afin de vérifier ceci, un essai de saturation de la CP radiomarquée tel que décrit à la section 4.1.2 devrait être exécuté. Le mutant étant largement retenu à l'intérieur de la cellule et n'étant pas ou peu réchappé par les CP, il est nécessaire de marquer radioactivement les composés eux-mêmes. Encore une fois, le choix et l'emplacement de l'isotope sera important, car un trop gros atome pourrait entraver la liaison de la CP radiomarquée, ce qui ne permettrait pas de faire avancer la question pour le P299H.

Toutefois, un gain notable de l'expression à la surface cellulaire du P299H peut être observé avec le composé **AT3186**. Elle n'est pas rétablie à 100% (soit le niveau du WT **non traité**), mais à la différence des traitements avec les antagonistes, elle augmente malgré tout d'environ 40%. Dans le cas d'une rétention dans le RE dû à l'impossibilité de se coupler à la protéine G, l'hypothèse qu'un agoniste puisse aider la liaison de la protéine G malgré la mutation de la proline du site consensus N/DPXXY pourrait être avancée. En effet, l'agoniste pourrait favoriser l'adoption d'une conformation dite active, contrairement aux antagonistes. Par contre, ceci ne favorise vraisemblablement que l'expression à la surface cellulaire car aucune augmentation d'AMPc n'est stimulée par le NDP- α -MSH. La stabilisation de la conformation n'est peut-être que transitoire (nécessite la liaison de la CP) ou bien la proline est trop importante dans l'activation de la protéine G [7].

Un essai d'interaction du récepteur avec la protéine G par BRET permettra tout d'abord de voir si le P299H interagit avec la protéine G (en prenant comme contrôle positif le WT). Si ce n'est pas le cas, le traitement avec l'**AT3186** pourrait potentiellement permettre cette interaction : une hausse de BRET serait attendue. Si le récepteur interagit quand même avec la protéine G sans traitement, l'**AT3186** pourrait faire diminuer le BRET50 (augmenter l'affinité relative du récepteur pour la protéine G). Le cas échéant, l'importance de la proline dans l'activation de la signalisation serait mise à jour par l'absence de transmission du signal malgré une interaction entre le récepteur et la protéine G.

Malgré la position de la mutation à proximité du côté intracellulaire, il pourrait aussi être possible que la substitution P299H entrave la liaison du NDP- α -MSH. Ce phénomène se produit chez d'autres RCPG, soit l'ET_BR (récepteur de l'endothéline de type B) et le GnRHR (récepteur de la gonadolibérine), où la mutation de la proline du motif N/DPXXY semble diminuer la capacité de liaison du mutant [130-132]. Un essai de saturation du P299H par le I¹²⁵-NDP- α -MSH pourra répondre à cette interrogation. Un rétablissement préalable de l'expression à la surface cellulaire du P299H par l'**AT3186** est toutefois nécessaire afin que le mutant puisse être en contact avec le radioligand imperméable à la membrane. Le co-traitement de l'**AT3186** avec l'antagoniste peptidique SHU9119 pourrait potentiellement aider à augmenter le pool de récepteur à la surface cellulaire en prévenant la désensibilisation des récepteurs réchappés par l'AT3186. Encore une fois, des lavages seront nécessaires avant de procéder à la saturation afin de libérer le site de liaison des récepteurs pour le I¹²⁵-NDP- α -MSH.

4.1.5 La comparaison des CP

L'**AT3163** semble le plus efficace des CP pour restaurer la fonctionnalité du R165W, suggérant que cette mutation confère un gain de fonction que ce composé permet de mettre en valeur (par l'adoption d'une conformation hyperactive).

L'**AT3228** est plus efficace que l'**AT3163** quant au rétablissement à la surface cellulaire des mutants S58C et R165W et du WT. La restauration de la fonctionnalité relative est toutefois de moindre effet pour le S58C et le R165W, et est plus grande pour le WT. Une trop grande affinité de l'**AT3228** pour les mutants a été suggérée pour expliquer ce phénomène, en empêchant la liaison du ligand NDP- α -MSH par compétition pour le site

de liaison. Cette hypothèse ne tient que si cette affinité n'est grande que pour les mutants, car le WT a, contrairement aux mutants, une fonctionnalité supérieure à la normale par rapport à son expression à la surface cellulaire.

L'**AT3186** semble moins efficace que les autres CP, mais ceci pourrait être dû à la propriété d'agoniste de composé. En effet, la désensibilisation et l'internalisation sont suspectées comme ayant un rôle majeur dans l'effet observé de l'accumulation d'AMPc stimulée par le NDP- α -MSH et de l'expression à la surface cellulaire. Les expériences proposées pourront mieux révéler l'action de cette CP.

En résumé, les différences observées pourraient être dues aux affinités distinctes des mutants pour le ligand, pour la CP ou pour la protéine G, avec ou sans traitement. Certaines mutations sont peut-être plus facilement « réchappable » que d'autres, une CP peut être plus efficace pour un mutant, et une autre CP pourrait l'être tout autant pour un autre mutant.

Malgré les différences dans la réponse des divers mutants, les composés **AT3163**, **AT3186** et **AT3228** agissent bel et bien en tant que CP. D'ailleurs, plusieurs autres mutants du MC4R ont été testés dans le laboratoire, et la plupart montraient une réponse à certains de ces composés, ce qui met en valeur leur potentiel thérapeutique du large spectre de mutations réchappées. Afin de mieux connaître leur mode d'action et leurs effets sur les mutants, plusieurs expériences ont été proposées. La divergence et/ou convergence des résultats obtenus suite à ces différents essais selon le mutant et la CP utilisés devrait aider à mieux comprendre le mécanisme d'action des CP.

4.2 Effet des CP sur la maturation du MC4R

Compte tenu que les résultats obtenus jusqu'à maintenant suggèrent une action de CP des composés **AT3163**, **AT3186** et **AT3228** en rétablissant l'expression à la surface cellulaire et la fonctionnalité des MC4R mutants, il était attendu que les CP favorisent aussi la maturation. Par maturation, on entend : l'adoption d'une conformation correcte et l'acquisition des modifications post-traductionnelles intrinsèques au récepteur (ponts disulfures, glycosylation). Tel qu'expliqué en détails à la section 3.2, le patron de N-

glycosylation permet de suivre la maturation du récepteur, par les ajouts de résidus de sucres sur l'oligosaccharide précurseur (acquis au niveau du RE) qui se produit de manière séquentielle au cours de la progression du récepteur dans la voie de sécrétion. À partir du saccule médian du Golgi, où les premiers résidus de sucres sont ajoutés, l'arborescence de l'oligosaccharide causent une résistance dans la migration des protéines par SDS-PAGE, résultant en une augmentation de la masse moléculaire apparente du récepteur. Cette forme de plus haute masse moléculaire apparente est associée à un récepteur mature.

4.2.1 Profil de maturation du MC4R par immunobuvardage de type Western

4.2.1.1 IP sur lysat total

En faisant une IP sur le lysat total de cellules exprimant de manière stable les différentes constructions 3HA-MC4R (WT, S58C, R165W ou P299H) traitées ou non avec les différentes chaperones pharmacologiques spécifiques au MC4R (**AT3163**, **AT3186**, **AT3228**), des différences dans le profil de migration des diverses conditions étaient attendues, tel que pour le V2R (figure 3.2A). Effectivement, dans le cas du V2R, la faible présence d'une bande de plus haute masse moléculaire correspondant à la forme mature chez le mutant V2R(W164S) et l'augmentation de son intensité suite à un traitement avec la CP spécifique au V2R, le **SR121463**, confirme l'action de cette CP sur la maturation, par la maturation (*processing*) de l'oligosaccharide précurseur.

L'absence de différence dans le patron des 3HA-MC4R traités ou non avec les CP **AT3163**, **AT3186** et **AT3228**, et ce, malgré l'augmentation de l'expression à la surface cellulaire observée à la figure 3.1A, a mené à 2 hypothèses.

La première hypothèse est l'absence de maturation de l'oligosaccharide précurseur du MC4R, et ainsi, la présence de forme dite immature à la membrane plasmique. La deuxième hypothèse est qu'il y a des récepteurs matures, mais que le ratio de récepteur mature/immature soit beaucoup plus faible que pour le V2R (figure 3.2B). Le ratio serait tellement faible qu'il ne serait pas possible de distinguer la bande mature par contraste avec la forte intensité de la bande immature.

L'immunoprécipitation des récepteurs présents à la surface cellulaire (IP de surface) a alors permis de confirmer qu'il s'agissait bien d'un faible ratio mature/immature plutôt que de l'absence de récepteur mature (figure 3.5). Ceci suggère que le récepteur MC4R, même sauvage (WT), est largement retenu à l'intérieur de la cellule. Cette rétention suggère une instabilité du MC4R(WT), qui, par sa cinétique de maturation plus lente, s'accumule dans le RE.

Le fait que le récepteur soit exprimé dans un système hétérologue (HEK293T) pourrait expliquer cette faible cinétique de maturation. En effet, il est possible que l'absence de protéines accessoires du MC4R tel que mentionné dans l'introduction soit responsable du mauvais trafic du MC4R. Pour un membre de la famille MCR, le MC2R, la présence d'une telle protéine est nécessaire pour assurer son trafic, soit MRAP1 et 2 [77, 133, 134]. Étant donné que le MC4R fait partie de la famille du MC2R, il est tentant de penser que les MRAP1 et 2 pourrait avoir le même effet bénéfique sur le MC4R. Or, lorsque les MRAP1 et 2 sont exprimés avec le MC4R, l'effet contraire est observé : l'expression à la surface cellulaire du MC4R est diminuée [77].

Tel que mentionné dans l'introduction, plusieurs autres RCPG ont recours à ce genre de protéines accessoires [76, 78, 79]. ALP (*attractin-like protein*), une protéine ayant été identifiée comme interagissant avec le domaine C-terminal du MC4R par un essai double-hybride sur une librairie d'ADNc de cerveau de souris [135], pourrait potentiellement assumer ce rôle. Cette protéine est localisée dans les mêmes régions du cerveau que le MC4R. Un rôle d'ALP dans la signalisation du MC4R est suspecté, mais aucune donnée ne permet de conclure que ce rôle soit dans le trafic du récepteur. Un essai de rétablissement à la surface cellulaire en condition de coexpression du MC4R avec ALP avec et sans traitement par les différentes chaperones pourrait répondre à cette question. Par contre, il est possible que, même en présence d'une protéine accessoire, l'expression à la surface cellulaire des mutants ne soient pas améliorée. C'est le cas de plusieurs mutants du MC2R qui sont retenus à l'intérieur de la cellule malgré leur forte interaction avec les MRAP1 et 2 [136].

Un marquage métabolique aurait potentiellement permis de distinguer le MC4R du V2R en révélant une telle cinétique de maturation lente. Tel que discuté à la section 4.1.1.1.1, cet essai a été tenté sur le MC4R(WT), mais n'a été réussi qu'une seule fois (voir figure 7.3, annexe) et à première vue, semble suggérer une cinétique de maturation lente du MC4R à

comparé au V2R (figure 7.3B). Les conditions devront être optimisées avant de pouvoir tirer une conclusion franche sur la maturation du récepteur.

4.2.1.2 IP de surface

4.2.1.2.1 Confirmation des formes immature et mature

La forme mature du MC4R a pu être révélée en augmentant le ratio mature/immature en enrichissant les récepteurs à la membrane plasmique par une IP de surface (voir figure explicative 3.3). Une digestion avec des endoglycosidases a permis d'identifier les bandes correspondant à la forme mature et immature sur les immunobuvardages de type Western. En effet, l'oligosaccharide complexe présent sur le récepteur mature est insensible à l'EndoH, tandis que l'oligosaccharide précurseur présent sur la forme immature peut être clivé par cette enzyme. Tel que soulevé dans la section 3.3.2, le nombre respectif de sites de N-glycosylation du V2R et du MC4R est à la source de la plus grande mobilité électrophorétique de la forme déglycosylée du MC4R. En effet, le V2R n'a qu'un seul site de N-glycosylation, tandis que le MC4R a 4 sites potentiels.

Afin de confirmer que ces sites potentiels sont bien tous N-glycosylés, un essai de digestion avec l'EndoH à différents temps d'incubation aurait pu être exécuté. En effet, la digestion partielle du récepteur immature permettrait de distinguer différentes bandes, chacune correspondant à un certain niveau de déglycosylation [137]. La présence de (X) intermédiaires de digestion (masse moléculaire entre 43k Da et 33 kDa) permettrait de conclure qu'il y a (X-1) site de N-glycosylation, étant donné que la forme de plus faible masse moléculaire apparente est non glycosylée.

La présence de la bande correspondant à la forme déglycosylée à ~32 kDa est surprenante. Une baisse de la masse moléculaire ne peut qu'être attribuée à un clivage du récepteur. Étant donné que la digestion se fait suite à une IP de surface, cela ne peut être un sous-produit de dégradation. Le clivage se produit nécessairement suite à la digestion, car dans la situation sans enzyme, la forme immature est à l'endroit prédit, soit 43kDa. La compagnie fournissant les endoglycosidases ont contrôlé l'absence de l'activité protéase dans sensiblement les mêmes conditions que celles que nous avons utilisées. L'essai est aussi fait en présence d'inhibiteurs de protéases. Il est donc fort probable que le récepteur déglycosylé ait une migration aberrante. Ceci pourrait être attribué à la liaison d'une plus

grande proportion de SDS sur ce récepteur dont la séquence primaire est riche en résidus lipophiles. En effet, le MC4R est l'un des plus petits RCPG : puisque ses domaines intra- et extracellulaire sont plus courts, ce récepteur a moins de résidus hydrophiles que la moyenne des RCPG. Le récepteur porte alors une charge négative proportionnellement plus grande grâce au SDS, ce qui le fait migrer plus rapidement.

4.2.1.2.2 Présence de récepteur immature sur les immunobuvardages des IP de surface

Une grande quantité de récepteurs immatures a été immunoprécipitée dans l'essai d'IP de surface du MC4R, alors que ce n'est pas le cas pour le V2R. La possibilité que des récepteurs immatures du MC4R soient présents à la surface ne peut être écartée. Toutefois, cette proportion d'immature ne semble pas affectée par le traitement. Si l'immature était présent à la surface à l'état basal, le traitement devrait favoriser l'expression à la surface cellulaire de cette forme aussi. Le fait que la proportion de récepteur immature sur les immunobuvardages des IP de surface du MC4R et du V2R soit proportionnelle aux populations immatures totales respectives de ces deux récepteurs (figure 3.2) favorise l'hypothèse d'une contamination de notre préparation immunoprécipitée par les récepteurs intracellulaires immatures. La quantité de récepteurs MC4 immatures dans la cellule étant largement majoritaire par rapport au MC4R mature (voir figure 3.2B), la bande immature de l'IP de surface est plus importante que dans le cas du V2R, pour qui le ratio mature/immature est beaucoup plus fort. La contamination par les récepteurs intracellulaire est alors beaucoup plus faible pour le V2R. Rappelons que l'hybridation de l'anticorps anti-HA sur les cellules entières est suivie de l'élimination subséquente de l'excès d'anticorps libre par des lavages préalablement à la lyse cellulaire. Les billes protéine G-sépharose sont ensuite ajoutées dans le lysat cellulaire total (se référer à la figure 3.3). Des conditions plus douces d'incubation des cellules avec l'anticorps pourraient permettre de minimiser la lyse cellulaire prématurée causant la contamination.

4.2.1.2.3 Correspondance entre l'effet des CP sur la maturation et l'expression à la surface cellulaire

Le premier élément à remarquer est que l'augmentation à la surface cellulaire des conditions traité et non traité de l'IP de surface (figure 3.5), pour une même construction, corroborent généralement les résultats de l'essai de rétablissement de l'expression à la

surface cellulaire par la cytométrie de flux (figure 3.1A). Les correspondances ne sont pas toujours parfaites, étant donné que l'essai de cytométrie de flux est quantitatif, alors que l'essai d'IP de surface ne l'est pas. En effet, alors que la quantité totale d'échantillon peut être directement mesurée (quantifiée) par la fluorescence de l'étiquette Venus du récepteur en cytométrie de flux, l'absence d'un contrôle pouvant indiquer la véritable quantité totale de récepteur pour les échantillons d'IP de surface en fait un essai semi-quantitatif.

Par exemple, la proportion de récepteurs à la surface cellulaire entre le WT et les mutants en IP de surface ne correspond pas à celle mesurée en cytométrie de flux. Effectivement, l'expression à la membrane plasmique du WT traité avec les CP vue par l'IP de surface est largement supérieure à celle des mutants (figure 3.5), tandis qu'une expression similaire ou même plus faible était généralement observée en cytométrie de flux. Cette divergence provient peut-être d'un biais dans la manière que nous avons contrôlé pour la quantification. En effet, les échantillons de l'IP de surface ont été ajustés par rapport au contrôle de chargement qu'est l'IP du surnageant (tel que décrit à la section 3.3.1). Nous sommes partis de l'hypothèse que la quantité de récepteur immature (intracellulaire) tend vers la quantité de récepteur MC4 total pour faire la standardisation des échantillons. Or, il est possible que la quantité de MC4R(WT) intracellulaires soit réellement plus faible que pour les mutants, ce qui serait attendu en temps normal. Ceci aurait pour effet de sous-estimer la quantité de récepteur total, résultant en la mise sur gel d'une trop grande quantité d'échantillon d'IP de surface du WT. On ne peut donc pas comparer les différents niveaux d'expression entre les mutants (« inter-mutant ») pour l'IP de surface.

Toutefois, les échantillons traités et non traités d'un même mutant (conditions « intra-mutant ») sont relativement quantitatifs, étant donné que nous avons travaillé avec des cellules exprimant de manière stable chaque construction. Pour une même construction, la seule condition expérimentale différente entre les conditions traités et non traités est la CP utilisée. Comme les CP ne semblent pas avoir d'effet sur la prolifération cellulaire et que nous avons travaillé avec un même nombre de cellules, une même quantité de matériel pour chaque condition est maintenue constante. Ceci permet ainsi la comparaison des conditions « intra-mutant ».

Afin de rendre l'IP de surface plus quantitative entre les différents mutants, il aurait fallu dupliquer la quantité de cellules avec lesquelles travailler pour pouvoir diviser les

échantillons en deux portions lors de la lyse des cellules. Une moitié d'échantillon aurait servi à faire l'IP de surface, tandis que l'autre aurait servi à mesurer la quantité totale de récepteur.

Autrement, il aurait été possible de faire les IP de surface avec les constructions 3HA-MC4R-Venus afin de pouvoir quantifier la quantité de récepteur par la mesure de la fluorescence des cellules avant la lyse. Toutefois, l'ajout de cette étiquette ferait varier la masse moléculaire du MC4R.

4.2.1.2.4 Conclusion de l'essai

Selon ces observations, il serait tentant de conclure que les CP favorisent la maturation. Or, de par la nature de l'essai, ceci ne peut être confirmé sans réserve. En effet, advenant une action des CP sur le transport vers la surface cellulaire de récepteurs pris dans réseau trans-golgien ou dans des vésicules de sécrétion, les CP ne favoriseraient pas la maturation (car les récepteurs seraient déjà matures à ce niveau dans la voie de sécrétion), mais plutôt le transport vers la membrane plasmique. Toutefois, les résultats obtenus avec le V2R en IP sur le lysat total (figure 3.2A), montrent que la CP **SR121463** favorise la maturation. L'effet de CP sur la maturation a été montré précédemment pour le V2R [102, 103] et le δ OR [107] par le suivi de la masse moléculaire apparente du récepteur suite à un marquage métabolique combiné à une digestion avec les endoglycosidases EndoH et PNGase F. Malgré notre réserve quant à la confirmation d'une action sur la maturation, nous suspectons toutefois une telle action des CP spécifiques du MC4R. La réussite de l'essai de marquage métabolique au ^{35}S du MC4R pourrait confirmer cette hypothèse en révélant la promotion de la maturation par les CP par l'apparition d'une plus grande quantité de forme mature par rapport à la situation **non traité**.

4.3 Effet des CP sur la proximité du récepteur avec la CNX dans le RE

Suite aux résultats obtenus dans les sections précédentes, à savoir que les CP favorisent le trafic des récepteurs mutants à la membrane plasmique (cytométrie de flux et IP de surface – figures 3.1 et 3.3) et qu’elles semblent favoriser la maturation (IP de surface – figure 3.3), nous avons émis l’hypothèse que le site d’action des CP soit précoce dans le processus de maturation, soit au niveau de la rétention du récepteur dans le RE. Les résultats d’une précédente étude du V2R au laboratoire du Dr. Michel Bouvier suggèrent d’ailleurs que le site d’action de la CP du V2R soit au niveau du RE. En effet, le temps d’interaction entre le V2R(W164S) et la calnexine s’est vu diminué suite au traitement des cellules avec le **SR121463** (Virginie Bernier, résultats non publiés). La calnexine étant une protéine résidente du RE, l’altération de l’interaction du V2R(W164S) avec cette protéine confirme une action de la CP au niveau du RE.

4.3.1 Essai de proximité du récepteur avec la calnexine dans le RE suivi par BRET

Afin de vérifier si les CP du MC4R ont une action au niveau du RE, un essai de BRET a été élaboré. Le principe de cet essai est basé sur la variation du signal de BRET entre le récepteur et la calnexine (CNX). En augmentant graduellement la quantité de CNX-Venus coexprimée avec le récepteur-Luc, une courbe de saturation de BRET est obtenue (voir figure explicative 3.7). L’obtention d’une hyperbole pourrait suggérer une interaction directe entre les 2 protéines, toutefois, dans le cadre du système utilisé, le signal de BRET est plutôt un reflet du nombre de récepteur à proximité de la CNX. En effet, la saturation serait plutôt associée à la grande densité de protéines présentes dans le RE par la surexpression de ces protéines membranaires, où le signal de BRET serait issu d’interactions directes et de collisions aléatoires entre le récepteur et la CNX.

Le signal de BRET obtenu à saturabilité (BRET_{max}) est alors un indicateur de la quantité de récepteur à proximité (<100 Å) de la CNX-Venus. La CNX étant résidente du RE, si la CP fait diminuer la proximité de la CNX et du récepteur (donc le BRET_{max}), l’action de la CP au niveau du RE sera confirmée, que ce soit en diminuant le nombre d’interactions

directes avec la CNX par l'adoption d'une conformation favorable à la dissociation du système de contrôle de qualité, ou en diminuant le nombre d'interactions directes et indirectes (collisions aléatoires) par la promotion de l'export du récepteur du RE. Si l'action principale de la CP était au niveau du RE, une baisse de BRETmax associée à la sortie du RE de récepteurs (pour augmenter l'expression à la surface cellulaire) serait attendue.

Selon cette considération, contrairement aux expériences classiques de BRET où le BRET50 est utilisé comme mesure relative de l'affinité entre les 2 interacteurs, le BRET50 ne peut être utilisé dans la situation d'un essai de proximité. Tout d'abord, il faut rappeler que le BRET50 est la valeur associée à la quantité de CNX-Venus nécessaire pour atteindre la moitié du BRETmax [122]. Or, suivant un traitement, les 2 protéines suivies par BRET (récepteur-Luc et CNX-Venus) ne sont pas nécessairement toujours exprimées dans le même compartiment au même ratio : le gain d'expression à la surface cellulaire suite aux traitements en est le reflet. En considérant que la baisse de BRETmax est en grande partie due à la sortie du récepteur-Luc du RE, qui est ainsi incapable d'interagir avec la CNX-Venus, la ségrégation du donneur d'énergie entraîne une dilution du signal, avec une telle baisse de BRET que nous ne pouvons plus interpréter le BRET50 comme un changement relatif d'affinité.

Cet essai a été validé avec le V2R, où une hausse importante de BRETmax a été observée entre la CNX-Venus et le V2R(W164S)-Luc à comparé au BRETmax obtenu avec le V2R-Luc. La plus grande proximité du mutant avec la CNX (plus grand BRETmax) est cohérente. Ce fort BRETmax entre le mutant et la CNX a été diminué significativement suite au traitement avec la CP spécifique au V2R (**SR121463**), indiquant une diminution de la proximité avec la CNX. Ces observations ont corroboré avec les résultats précédents dans le laboratoire du Dr. Bouvier où le temps d'interaction entre le V2R(W164S) et la CNX suite à un traitement avec la CP **SR121463** était diminué (vu par colP suite à un marquage métabolique suivi de chasses). L'action de la CP au niveau du RE est donc corroborée, ainsi que la validité de l'essai.

L'utilisation de cet essai de BRET est donc justifiée pour voir l'action des CP : le BRETmax diminuera si les CP agissent au niveau du RE, peu importe que ce soit une diminution de l'interaction directe avec la CNX et/ou une sortie du récepteur du RE.

4.3.1.1 Le MC4R(WT) a une plus grande rétention dans le RE que le V2R(WT)

Le BRETmax basal plus élevé (donc la proximité avec la CNX plus élevée) entre le MC4R(WT)-Luc et la CNX-Venus par rapport au couple V2R(WT)-Luc/CNX-Venus renforce l'hypothèse d'une plus forte rétention du récepteur dans le RE. Cette rétention pourrait être causée par une cinétique de maturation plus lente du MC4R par rapport au V2R, telle que proposée précédemment par la démonstration du faible ratio de récepteur mature/immature (figure 3.2 et 3.3). Les causes de cette cinétique d'interaction plus lente ont été discutées à la section 4.2.1.1. Brièvement, l'absence d'une protéine de transport spécifique au MC4R dans les cellules HEK293T (tel qu'il est le cas pour d'autres RCPG [76-79]) pourrait être la cause de la forte rétention intracellulaire du MC4R(WT). Ce problème de maturation n'est pas observé chez le V2R, pour qui le récepteur (WT) est très bien maturé tel que visible sur l'immunobuvardage de l'IP du lysat total (figure 3.2A). Le marquage métabolique suivi de chasses de différents temps du V2R montre une cinétique rapide par la maturation de la majorité des récepteurs immatures après seulement 90min de chasse (figure 7.3B et [102]) contrairement, par exemple, au δ OR qui prend de 4 à 7 heures pour se rendre au même niveau de maturation [137].

4.3.1.2 Les mutants du MC4R ont une plus faible rétention dans le RE que le V2R(W164S)

Dans le cas des mutants en situation **non traité**, les BRETmax ne sont pas considérablement plus fort que le MC4R(WT), contrairement au V2R(W164S) par rapport au V2R(WT). Le fait que le BRETmax du WT soit déjà élevé explique en partie pourquoi la variation est plus faible, et appuie l'hypothèse d'une cinétique de maturation lente pour le MC4R(WT).

4.3.1.3 Effet des CP sur la proximité du récepteur avec la CNX dans le RE

Sur la base de l'hypothèse que les CP ont une action précoce sur la maturation, il a été supposé que les CP, en aidant au repliement des mutants retenus dans le RE, favorisent l'export vers la membrane plasmique, ainsi la sortie du RE. Malgré le gain considérable de l'expression à la surface cellulaire, la diminution de la proximité du récepteur avec la CNX n'a pas été observée dans chaque cas, et lorsqu'elle a été observée, n'a pas été aussi importante que dans le cas de notre référence, le V2R.

4.3.1.3.1 L'agoniste **AT3186** semble être plus efficace pour diminuer la proximité du MC4R avec la CNX

Il semble que le composé agoniste **AT3186** soit le composé favorisant le plus la diminution du BRETmax (et des mutants, et du WT), ce qui est traduit par une action de cette CP au niveau du RE. Les faibles rétablissements de l'expression à la surface cellulaire ne laissaient pas pressentir cette possibilité. Toutefois, tel qu'il a déjà été discuté, l'action agoniste de ce composé pourrait « cacher » son véritable effet de réchappement à la surface cellulaire en causant la désensibilisation et l'internalisation.

Il est possible que l'agoniste engendre une augmentation de la cinétique de maturation plus importante que les antagonistes. Ceci aurait pour effet de diminuer le nombre d'interactions (directes et indirectes) entre le MC4R et la CNX à l'équilibre, qui serait traduit en un plus petit taux de renouvellement (turnover) de l'interaction entre les deux protéines, à l'équilibre.

Il est important de souligner que malgré la significativité des différences de BRETmax, ces variations sont très modestes à comparé à l'effet du **SR121463** sur le V2R(W164S).

4.3.1.3.2 L'**AT3228** diminue le nombre de récepteur mutants à proximité de la CNX

Contrairement à ce qui a été vu avec la CP **AT3186**, le traitement avec l'antagoniste **AT3228** diminue le nombre de récepteur mutants S58C et R165W à proximité de la CNX, mais pas celui du WT. L'absence d'effet pour le MC4R(WT) n'est pas surprenante étant donné que le gain en expression à la surface cellulaire est beaucoup plus faible que dans le cas des mutants (soit une augmentation de la proportion d'expression à la surface cellulaire des situations traité/non traité de ~160% pour le WT versus ~560% pour le S58C et ~1440% pour le R165W). Il est aussi possible que les récepteurs WT enrichissant la proportion à la surface cellulaire proviennent plutôt d'une rétention en aval de la CNX et possiblement hors du RE, soit dans le Golgi.

Cette hypothèse d'une rétention plus tardive dans la voie de sécrétion est supportée par une autre observation. En effet, le BRETmax plus élevé des mutants en condition **non traité** indiquent qu'ils sont à une plus grande proximité de la CNX que le WT. Or, le R165W ne semble pas être retenu à un niveau beaucoup plus élevé que le WT **non traité**.

Une rétention en aval de la CNX pourrait expliquer le gain phénoménal d'expression à la surface cellulaire du R165W par l'**AT3228** sans qu'il n'y ait de variation majeure du BRETmax. Étant donné les différents niveaux de proximité des récepteurs avec la CNX, il y a peut-être différents ratios de rétention RE/Golgi pour chaque mutant.

4.3.1.3.3 L'AT3163** ne réussit à diminuer le nombre de récepteur à proximité de la CNX que pour le mutant S58C**

Seule la sortie du S58C semble promue par l'**AT3163**. Cette CP favorise pourtant fortement l'expression à la surface cellulaire du R165W. Toutefois, il faut rappeler que la diminution du BRETmax perçue est très modeste.

Le fait que le R165W **non traité** n'ait pas un BRETmax beaucoup plus grand que le WT **non traité** pourrait peut-être expliquer qu'aucune différence de BRETmax ne soit observée lorsque le R165W est traité avec l'**AT3163**, puisqu'il est attendu que le BRETmax des mutants rejoigne le BRETmax du WT **non traité**. Pourtant, une hausse importante de l'expression à la surface cellulaire du R165W (d'environ 540%) a été observée en cytométrie de flux (figure 3.1A).

Encore une fois, ceci corrobore l'hypothèse que le R165W soit principalement retenu en aval de la CNX et possiblement du RE, ce qui pourrait expliquer l'absence d'effet sur l'interaction CNX-Venus/MC4R(R165W)-Luc. Alors que l'**AT3228** aurait une action un peu plus forte au niveau du RE (quoique les différences soient modestes), l'**AT3163** agirait peut-être plutôt en aval. Une différence sur le site d'action des CP antagonistes serait alors peut-être mise à jour. Toutefois, cet énoncé doit toujours être tempéré par le fait que l'ampleur des effets est faible.

4.3.1.3.4 Hypothèses de l'effet modeste des CP du MC4R dans l'essai de BRET

Le fait que les diminutions de BRETmax soit généralement faibles pour le MC4R malgré une grande augmentation de l'expression à la surface cellulaire du récepteur induite par les CP (et surtout les CP antagonistes) (figure 3.1A et 3.5A) est surprenant. Deux possibilités sont alors envisageables : soit que la majorité de la rétention se fait en aval de la CNX, possiblement au niveau du Golgi, soit que la surexpression de la CNX dans cet essai est délétère sur l'action des CP du MC4R dans le rétablissement de ces récepteurs.

Quoique l'essai ait été validé avec le V2R par la corroboration des résultats avec ceux obtenus par une autre méthode (marquage métabolique suivi de chasses de différents temps combiné à des colP), la surexpression de CNX dans le cadre de cet essai pourrait avoir un effet délétère sur l'action des CP sur le MC4R en particulier. Rappelons que la CNX est impliquée dans le système de contrôle de qualité et dans la rétention de récepteur mal repliés au RE. Advenant une plus forte sensibilité du MC4R à la CNX que le V2R par sa moins grande capacité au repliement (plus faible cinétique de maturation), la surexpression de la CNX pourrait provoquer la rétention du MC4R et amoindrir l'effet des CP qui lui sont spécifiques. Il faudrait alors vérifier l'effet de la surexpression de CNX sur la restauration de l'expression à la surface cellulaire afin de voir s'il y a effectivement un effet négatif sur l'action des CP.

Sinon, on pourrait suspecter que même si la rétention dans le RE est importante, un deuxième point de contrôle en aval pourrait être la cible des CP. Ce phénomène existe pour certains mutant du V2R, qui sont plutôt retenus au niveau du Golgi [138]. Il a été confirmé par microscopie de fluorescence que le MC4R est aussi présent dans l'ERGIC, par colocalisation avec ERGIC-53 (résultats non montrés, Patricia René). La colocalisation du MC4R avec différents marqueurs golgiens par microscopie de fluorescence devrait être vérifiée pour préciser le site de rétention de ce récepteur. Par exemple les marqueurs suivants pourraient être utilisés : le GM130 (*Golgi matrix protein 130*) est un marqueur du *cis*-Golgi [139], le TGN38 est un marqueur du réseau *trans*-golgien (*trans-Golgi network*) [140-142] et l'alpha-mannosidase II [142] est un marqueur du Golgi médian. Ce sont des marqueurs fréquemment utilisés dans la littérature.

Un essai de BRET entre le récepteur-Luc et des partenaires golgiens de différents niveaux du Golgi pourrait être intéressant à entreprendre afin de raffiner l'essai déjà mis en place. En effet, la présence ou absence de BRET aux différents niveaux du Golgi avec ou sans traitement avec les CP pourra préciser le site de rétention du récepteur en cellules vivantes. Il faudrait d'abord choisir des protéines résidentes des différents compartiments du Golgi. Des enzymes glucosidases ou glucosyltransférases pourraient être de bons candidats, étant donné la restriction de leur expression à certains saccules (mannosidase du Golgi II, GlcNAc transférase I, etc). Aussi, leur topologie est favorable à l'ajout d'un fluorophore : le site actif de ces enzymes est du côté luminal et ce sont des enzymes ayant un domaine transmembranaire. L'étiquette pourra alors être placée du côté cytosolique pour être dans le même compartiment de la cellule que la Luc du récepteur

(placée en C-terminal) sans affecter la fonction de l'enzyme. Il faudrait toutefois s'assurer que cette modification n'interfère pas avec la localisation cellulaire de ces enzymes en bloquant leur transport (la liaison aux COP ou aux protéines de transport, par exemple). Une mauvaise localisation compromettrait l'interprétation du résultat.

Étant donné que plus de 180 gènes de glycosyltransférases ont été rapportés jusqu'à maintenant [143] et qu'on ne connaît pas la structure des N-glycans sur le MC4R, il serait difficile de trouver une glycosyltransférase spécifique au MC4R. En considérant que le BRET soit basé sur les collisions aléatoires dû à un encombrement de l'organite pourrait être suffisant pour percevoir un signal, il serait possible de choisir une enzyme qui n'est pas nécessairement impliquée dans la glycosylation/déglycosylation directe du MC4R.

La différence de l'effet des traitements avec les CP **AT3163**, **AT3186** et **AT3228** sur la diminution de la proximité avec la CNX laisse entendre une différence au niveau du site d'action. Le site d'action des CP serait vraisemblablement dépendant du site de rétention du mutant, mais aussi de la nature du mutant. Tel que discuté précédemment, il est nécessaire d'étudier l'effet agoniste de l'**AT3186** (sur la désensibilisation, sur la dégradation au niveau du RE, etc.) et les effets à plus courts termes du traitement avec ce composé afin de mieux comprendre son effet. L'essai de sortie du RE en BRET avec le MC4R ne permet pas de conclure sur le site d'action précis des CP. L'effet des CP entre le RE et la surface cellulaire est toujours inconnu. L'essai BRET avec des partenaires golgiens, s'il fonctionne, pourrait aider à mettre en lumière les sites d'action précis des CP, ainsi que le site de rétention des mutants. Sinon, des expériences de colocalisation du MC4R avec les différents marqueurs du RE, de l'ERGIC, du Golgi, du réseau trans golgien et de la surface suite aux différents traitements pourront donner une idée plus précise du site de rétention du récepteur et du site d'action des CP.

4.3.1.4 Certaines CP augmentent l'expression totale du MC4R

Il a été observé que le traitement avec certaines CP augmente l'expression totale du MC4R. En effet, une augmentation de la luminescence, qui est le reflet de la quantité de récepteur exprimé, a été observée pour l'**AT3186** et l'**AT3228** (voir figure 7.4, annexe). Ces composés ont soit la propriété de stabiliser le récepteur en diminuant la dégradation, soit ont un effet positif sur la transcription. Si l'effet de la CP est de stabiliser les

récepteurs normalement envoyés vers la voie de la dégradation associée au RE (ERAD), le blocage du protéasome 26S (si le MC4R est bel et bien dégradé par cet organe) devrait masquer l'effet de la CP sur l'expression totale. Sinon, si les CP favorisent la transcription, un gain de l'expression totale par la CP sera perceptible malgré le blocage du protéasome. Aussi, si le MC4R est ubiquitiné (ce qui pourrait être montré par une révélation avec un anticorps anti-ubiquitine sur l'immunobuvardage d'une IP du récepteur), la diminution du niveau d'ubiquitination du MC4R suite aux traitements pourrait appuyer l'hypothèse de la stabilisation du MC4R.

Si l'effet est plutôt au niveau transcriptionnel, il faut envisager un effet de la signalisation sur la transcription du MC4R. Ceci impliquerait des propriétés agonistes pour les composés ainsi que la présence d'un élément de réponse (normal ou atypique) à l'AMPc dans pcDNA3.1. Alors que l'**AT3186** est un agoniste pour la voie de l'adénylate cyclase, l'**AT3228** n'a été montré que comme agissant en tant qu'antagoniste. Afin de vérifier cette hypothèse, des cellules exprimant le MC4R conjointement au plasmide pcDNA3.1 contenant le fluorophore Venus devrait être stimulées ou non avec le NDP- α -MSH. Une plus grande fluorescence dans le cas stimulé indiquerait une plus grande transcription. Ainsi, l'augmentation de l'expression du MC4R serait attribuée à l'augmentation de la transcription, causée par une action agoniste des composés. L'**AT3228** a toutefois été caractérisé en tant qu'antagoniste pour la voie de l'adénylate cyclase. Soit que ce composé a une activité d'agoniste partiel pour l'AMPc, soit que l'**AT3228** est un agoniste pour une autre voie de signalisation (MAPK), qui à son tour activerait la transcription. En effet, au cours des dernières années, plusieurs études ont montré que différentes voies de signalisation peuvent être sélectivement modulées par des ligands distincts sur un même récepteur (signalisation biaisée par le ligand ou *ligand-biased signaling*) [144, 145]. Le fait que l'augmentation de l'expression totale ne soit pas observée chez le P299H corrobore l'option d'une promotion de l'expression totale de récepteur dépendante des voies de signalisation. En effet, le P299H est incapable de signaler, peu importe le traitement utilisé, et ne voit pas son expression totale augmentée.

4.3.1.4.1 Effet de l'augmentation de l'expression totale du MC4R sur le signal de BRET

Plus il y a de Luc pour une même quantité de Venus, moins il y a de BRET dû à l'augmentation du dénominateur pour un même numérateur dans le ratio Venus/Luc (voir

schéma 3.6). Les composés **AT3186** et **AT3228**, en augmentant fortement ou moyennement, respectivement, l'expression de tous les MC4R sauf le P299H, devraient théoriquement faire varier à la baisse les valeurs de BRET à des faibles niveaux de CNX-Venus dans ces cas particuliers (figure 7.4). Le composé **AT3163** ne semble pas avoir d'effet à ce niveau. Toutefois, les valeurs de luminescence varient en fonction de la quantité de CNX-Venus exprimée. À une forte expression de CNX-Venus (où le BRETmax est atteint), la luminescence a des niveaux comparables à la situation sans CNX-Venus : le BRETmax n'est donc pas affecté par les variations de luminescence. En effet, ces variations se produisent à faible expression de CNX-Venus, lorsque la saturation n'est pas atteinte, et n'a donc pas d'impact sur la formation du plateau.

La variation du niveau d'expression du récepteur semblant être affectée par la quantité de CNX-Venus exprimée, nous nous sommes demandé si la surexpression de la CNX-Venus pouvait affecter l'efficacité du traitement à réchapper l'expression à la surface cellulaire du MC4R. Tel qu'expliqué, le BRETmax n'était pas affecté par la variation de luminescence car les valeurs de Luc au plateau étaient similaire à la condition sans CNX. Par contre, la surexpression de CNX pourrait avoir un effet sur le trafic normal des récepteurs. Tel que mentionné précédemment, le MC4R semblant être plus retenu au RE que le V2R, l'effet de la surexpression de la CNX pourrait être supérieur pour le MC4R et ainsi atténuer l'effet des CP sur la diminution de la proximité du récepteur avec la CNX. Ceci pourrait expliquer pourquoi les différences de BRETmax observées suite au traitement avec les CP pour le MC4R ne soient pas aussi marquées que pour le V2R.

Afin de répondre à cette interrogation, un essai de rétablissement de l'expression à la surface cellulaire par les CP suivi par cytométrie de flux tel (qu'à la figure 3.1A) pourrait être exécuté, cette fois, en surexprimant la calnexine selon les conditions et les constructions utilisées pour faire les courbes de saturation de BRET. Les mêmes conditions que dans l'essai de sortie du RE en BRET devraient être utilisées en cytométrie de flux pour suivre le rétablissement à la surface en présence de surexpression de la calnexine. La diminution de l'amplitude du gain d'expression du récepteur à la membrane plasmique pour le MC4R appuierait l'hypothèse de l'effet délétère de la CNX sur l'efficacité des CP à rétablir l'expression du récepteur à la surface cellulaire.

Il pourrait être possible de limiter l'effet de la CNX sur les traitements en exprimant le moins possible de cette construction, et en l'exprimant de manière fixe de condition en

condition. Ceci pourrait être fait en exécutant une saturation de BRET en sens inverse, soit la saturation de la CNX-Venus par une quantité croissante de récepteur-Luc. En choisissant la plus faible concentration de CNX-Venus possible, la quantité de protéines surexprimée est minimisée. Pour chaque récepteur-Luc ajouté sans saturation des sites accepteurs (CNX-Venus), le signal de BRET reste le même : pour chaque Luc ajoutée, la Venus émise augmente proportionnellement, résultant en un ratio constant, étant le BRETmax (voir figure 4.1). Une fois arrivé à saturation, le BRETmax diminue suite à l'augmentation du signal Luc sans gain supérieur de Venus émise (ratio YFP/Luc diminue). Après un traitement avec les CP, la baisse du BRETmax devrait se produire, indiquant encore une fois la sortie du RE. Considérant qu'il y aurait probablement moins de collisions aléatoires entre les 2 partenaires de BRET dû à la diminution du niveau d'expression des protéines impliquées, le signal obtenu serait probablement plus directement associé à l'interaction directe entre le récepteur et la CNX.

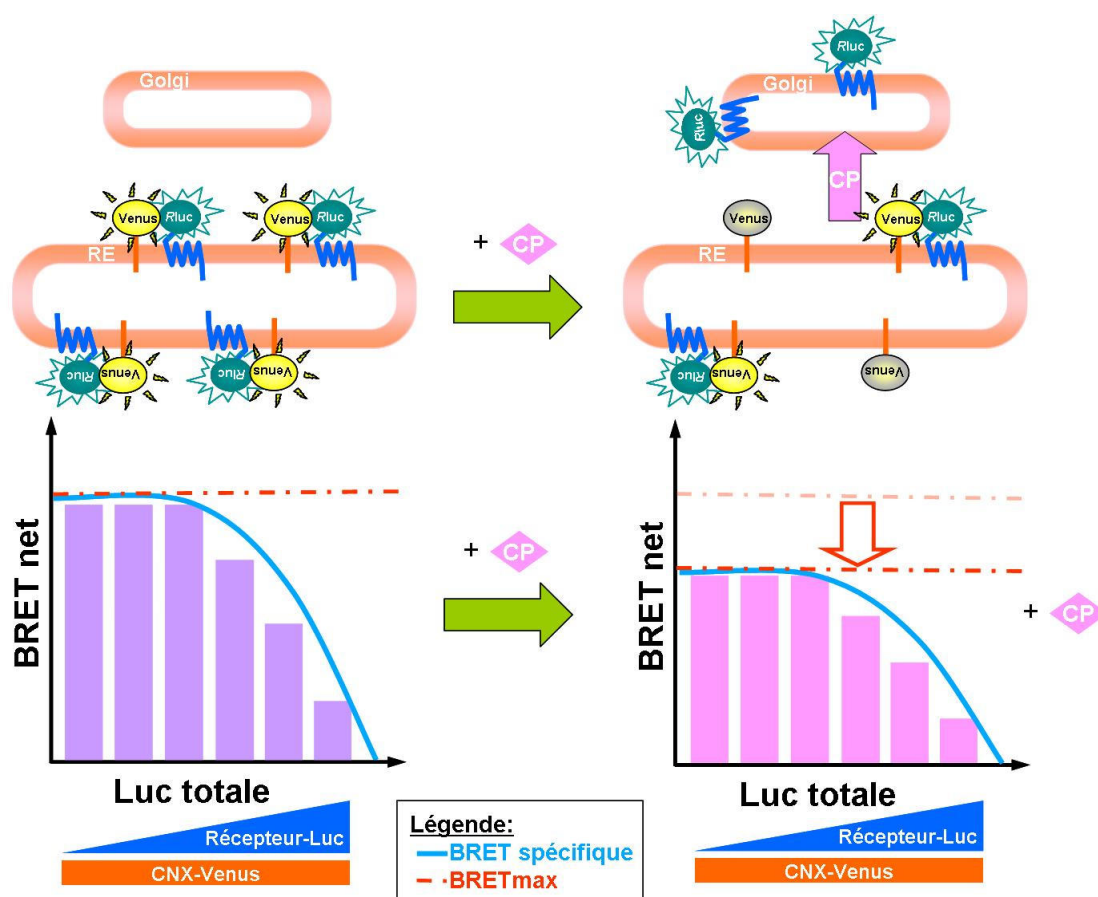


Figure 4.1. Courbe de saturation de la CNX-Venus par une quantité croissante de Récepteur-Luc (hypothèse). À la différence de la saturation du récepteur-Luc par la CNX-Venus, une quantité fixe de CNX est transfectée dans chaque condition, ce qui permet de réduire la variation du signal en fonction de la CNX.

4.3.1.5 Résumé de l'essai BRET

En résumé, le traitement avec les CP favorise dans certains cas la diminution de la proximité du récepteur MC4 de la CNX (baisse du BRETmax). La baisse du BRETmax entre le V2R(W164S)-Luc et la CNX-Venus suite au traitement avec sa CP spécifique (**SR121463**) atteste de la fonctionnalité de l'essai. Le haut niveau basal du MC4R(WT) par rapport au V2R(WT) suggère une plus forte rétention du MC4R dans le RE. Les faibles effets des CP du MC4R suggèrent une action en aval de la CNX. Par l'observation que le niveau d'expression de la CNX fait varier le niveau d'expression du récepteur, on peut suspecter que la surexpression de la CNX a un effet sur le signal. L'essai mériterait d'être optimisé afin de pouvoir tirer des conclusions claires.

4.4 Perspective thérapeutique des CP

Le manque de traitements adéquats pour les maladies causées par des mutations dans les gènes qui encodent des RCPG met en évidence le besoin de développer des thérapies alternatives à celles actuellement utilisées. La restauration de l'expression à la surface cellulaire et de la fonctionnalité de formes mutées de récepteurs normalement retenus à l'intérieur de la cellule grâce à des chaperones pharmacologiques (CP), pourrait offrir un nouveau mode de traitement pour ces maladies.

Le succès du traitement de la maladie du diabète insipide néphrogénique (DIN) par une chaperone pharmacologique spécifique au V2R est la preuve de principe que les CP puissent être utilisées à des fins cliniques et qu'elles puissent être efficaces pour le traitement d'une maladie conformationnelle impliquant un RCPG.

Ceci mène à penser que les composés utilisés dans cette étude (**AT3163**, **AT3186** et **AT3228**), ayant été prouvés comme agissant à titre de CP pour le MC4R en système cellulaire, pourraient éventuellement conduire à un test clinique visant à valider l'efficacité thérapeutique des CP du MC4R.

Avant de pouvoir être utilisé chez l'homme, les CP du MC4R devront montrer une bonne pharmacocinétique, soit 1) la capacité d'être absorbé par le système digestif s'il s'agit de comprimés oraux, 2) la capacité de se rendre à leur cible, 3) que les CP aient une bonne stabilité dans le sang et que les métabolites ne soient pas toxiques et 4) qu'il y ait une bonne clairance du produit. La cible des CP du MC4R étant exprimée dans le cerveau, un défi supplémentaire se pose par rapport au cas des CP du V2R : les composés devront être aptes à passer la barrière hémato-encéphalique.

La sélectivité des CP pour le MC4R est importante pour ne pas causer d'effets secondaires non désirables et potentiellement dangereux. Il faut tout d'abord une sélectivité à la famille MCR : il ne serait pas souhaitable que les CP du MC4R ait une action délétère sur le système β -adrénergique par exemple, qui pourrait causer des problèmes cardiaques. Une sélectivité pour le MC4R au sein de la famille des MCR est aussi importante, étant donné les diverses actions des différents sous-types. Elle est

toutefois particulièrement plus importante vis-à-vis du MC2R. Alors qu'une action sur le MC1R pourrait affecter la pigmentation et sur le MC5R pourrait engendrer une sudation excessive, l'activation du MC2R pourrait engendrer la maladie d'hypercortisolisme chronique. Une absence de sélectivité vis-à-vis du MC3R aurait peut-être de moindres conséquences, et pourrait même être bénéfique étant donné son implication dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. Toutefois, il ne faudrait pas qu'une CP antagoniste bloque le MC3R sans procurer à ce récepteur l'effet bénéfique des CP, car l'effet serait contraire à celui désiré. Dans le cas de l'**AT3228**, par exemple, ce genre de phénomène ne devrait pas arriver, car cette CP a une affinité de 6,9 nM pour le MC4R tandis qu'elle est de 2800 nM pour le MC3R [115].

Deux types de CP ont été présentés dans ce mémoire : les CP agoniste et antagoniste. L'avantage d'une CP agoniste du MC4R serait qu'en plus de restaurer son expression à la surface cellulaire, il stimulerait du même coup le récepteur. Le fait que le rétablissement de l'expression à la membrane plasmique et de la fonctionnalité dans notre étude soient sous le niveau de base du MC4R(WT) pour le S58C n'élimine pas l'**AT3186** comme CP potentielle. Un gain de ~60% de la fonctionnalité tel qu'observé pourrait quand même aider les patients atteints de la maladie d'obésité morbide précoce causée par la rétention du MC4R, qui sont, dans la grande majorité des cas, hétérozygotes. La stimulation du MC4R par cette CP pourrait être bénéfique à court terme en inhibant le sentiment de faim du patient, toutefois il est possible que la CP agoniste provoque la désensibilisation et l'internalisation du récepteur (telle qu'il a été proposée pour expliquer le faible gain en expression à la surface cellulaire et en fonctionnalité) menant à une perte de réponse à long terme. En situation physiologique, la stimulation chronique avec cette CP agoniste pourrait même mener à une régulation négative du récepteur, soit la perte du nombre total de récepteurs de la surface cellulaire par la dégradation des récepteurs pré-existants et possiblement par la déstabilisation de l'ARNm [146, 147].

Une CP antagoniste aurait l'avantage de ne pas induire une telle désensibilisation du récepteur (et même de stabiliser les récepteurs présents à la surface), toutefois, il pourrait entrer en compétition avec le ligand naturel et atténuer la réponse. Ceci met en évidence une problématique d'ordre chimique : les composés CP doivent avoir une affinité assez grande pour lier le récepteur mutant pour l'aider à se replier, mais cette affinité ne doit pas être trop grande pour empêcher le ligand naturel de le déloger une fois le récepteur rendu à la surface, tout en restant spécifique afin d'éviter les effets secondaires non désirés. Le

traitement avec une CP antagoniste s'est avéré efficace dans le cas du DIN causé par la rétention intracellulaire du V2R. Toutefois, le design thérapeutique est difficile à élaborer étant donné qu'il faut inclure une période de « lavage » dans la posologie (*wash out*) de l'antagoniste sur les récepteurs restaurés à la surface cellulaire pour permettre leur activation par le ligand naturel. Un compromis pourrait être l'utilisation de CP de type agoniste partiel. Il pourrait y avoir une légère action sur l'activation tout en restaurant l'expression à la surface cellulaire sans causer de désensibilisation extrême.

Un autre aspect intéressant de la présente étude est l'observation d'un effet des CP sur le MC4R(WT). D'après les résultats de l'augmentation d'accumulation d'AMPc stimulée par le NDP- α -MSH suite au traitement du MC4R(WT) avec les antagonistes (figure 3.1), il pourrait être envisagé d'utiliser ces traitements chez les personnes dont l'obésité ne dépend pas de facteurs génétiques. L'augmentation de l'expression du MC4R normal à la membrane plasmique aurait pour effet d'augmenter la capacité de signalisation à l'équilibre. Toutefois, il est possible que le MC4R(WT) ne soit pas autant retenu à l'intérieur des cellules qui l'expriment en condition physiologique : le gain observé dans les cellules HEK293T pourrait ne pas être reproduit *in vivo*. En effet, la présence de protéine accessoire nécessaire au bon trafic du MC4R (comme MRAP dans le cas du MC2R [77]) pourrait augmenter sa cinétique de repliement de base. Le traitement pourrait alors ne plus avoir d'effet.

Le fait que le rétablissement de l'expression à la surface cellulaire et de la fonction par les CP soit aussi favorisé pour le WT pourrait aussi avoir un impact chez les patients hétérozygotes chez qui la forme mutante ne répondrait pas ou peu aux CP. L'augmentation de la forme sauvage pourrait potentiellement aider ces patients.

En résumé, les composés étudiés dans ce mémoire ont été montré comme agissant à titre de chaperone pharmacologique pour le MC4R. Ces résultats montrent une ouverture pour le développement de CP du MC4R à visée thérapeutique. La prochaine étape est le suivi de l'effet des CP en situation *in vivo*.

5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La présente étude a permis de confirmer l'action de chaperone pharmacologique des composés **AT3163**, **AT3186** et **AT3228** sur les mutants du MC4R. Il a été observé que la quantité de récepteur MC4 mature est infiniment plus petite que celle de la forme immature, et ce, même pour le récepteur de type sauvage (WT). Ceci nous a fait suggérer une cinétique de maturation plus lente pour le MC4R que le V2R. Si tel est le cas, le MC4R se rapprocherait plutôt des récepteurs MC2R [148] et δ OR [149], qui ont aussi un problème de maturation dans les cellules HEK293T.

Ensuite, les traitements avec les CP semblent favoriser la maturation du MC4R, WT et mutants, de par la détection de forme mature à la surface. Finalement, un essai de proximité dans le RE a permis de montrer dans la plupart des cas une faible diminution des interactions directes et/ou des collisions aléatoires des récepteurs mutants avec la calnexine. Ces faibles diminutions du BRETmax avaient une plus ou moins grande amplitude, selon le mutant et la CP utilisée. En général, les effets observés ont été très modestes, indiquant deux possibilités : soit un problème dans la conception de l'essai, soit l'existence d'un site de rétention en aval de l'interaction avec la CNX (ou même du RE) pour le MC4R. Dans le premier cas, la surexpression de la calnexine pourrait retenir d'avantage le MC4R dans le réticulum endoplasmique, expliquant la faible baisse de BRETmax. Pour pallier à ce problème, nous avons tenté un essai de BRET où le récepteur-Luc sature la CNX-Venus, dont la concentration est faible et fixe. Une optimisation de cet essai a été débutée, et mérite d'être poursuivie. Dans le deuxième cas, les CP auraient pourraient potentiellement avoir une action au niveau du RE (d'où les variations observées), tel que suggéré pour le V2R, mais pourrait avoir un plus grand effet sur une population de récepteur retenus dans le Golgi. Les différents BRETmax observés entre les divers mutants **non traité** pourraient correspondre à différents ratios de rétention RE/Golgi spécifique au mutant.

Il serait intéressant de refaire les essais présentés dans ce mémoire dans un modèle cellulaire exprimant de façon endogène le MC4R, telle que la lignée hypothalamique GT1-1 [150] ou GT1-7 [151]. Advenant la nécessité d'une protéine accessoire ou la présence d'enzymes glycosidases/glycosyltransférases spécifiques nécessaire au bon trafic du récepteur, des effets différents pourraient être observés dans ce modèle, dont

probablement une maturation plus rapide du récepteur WT. Aussi, les différents essais proposés pour compléter la présente étude pourront apporter beaucoup d'information sur l'effet des CP sur les différents mutants. Une fois ces données amassées, un projet de modélisation moléculaire pourrait être lancé, afin d'aider à comprendre mécanisme chimique et conformationnel des CP sur le MC4R.

Pour finir, l'avenue des chaperones pharmacologiques comme traitement des maladies conformationnelles semble prometteuse. Afin d'obtenir la preuve de principe des effets des CP *in vivo*, un modèle de souris dont le gène *mc4r* a été substitué par le gène *mc4r* humain WT ou R165W (*knock in*) a récemment été généré. Le but ultime de ces études est d'arriver à un traitement contre l'obésité morbide précoce.

Il est primordial de continuer la recherche sur le mode d'action des CP, et ce, sur plusieurs différents récepteurs, afin de mieux comprendre le mécanisme d'action général pour éventuellement faciliter le développement de nouveaux composés encore plus efficaces et sans effets secondaires indésirables.

6. BIBLIOGRAPHIE

1. Gantz, I., et al., *Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor*. J Biol Chem, 1993. **268**(20): p. 15174-9.
2. Lubrano-Berthelier, C., et al., *Intracellular retention is a common characteristic of childhood obesity-associated MC4R mutations*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(2): p. 145-53.
3. Fan, Z.C. and Y.X. Tao, *Functional Characterization and Pharmacological Rescue of Melanocortin-4 Receptor Mutations Identified from Obese Patients*. J Cell Mol Med, 2009.
4. MacNeil, D.J., et al., *The role of melanocortins in body weight regulation: opportunities for the treatment of obesity*. Eur J Pharmacol, 2002. **450**(1): p. 93-109.
5. Gether, U. and B.K. Kobilka, *G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation*. J Biol Chem, 1998. **273**(29): p. 17979-82.
6. Rovati, G.E., V. Capra, and R.R. Neubig, *The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state*. Mol Pharmacol, 2007. **71**(4): p. 959-64.
7. Fritze, O., et al., *Role of the conserved NPxxY(x)5,6F motif in the rhodopsin ground state and during activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2290-5.
8. Gripenrog, J.M., A.J. Jesaitis, and H.M. Miettinen, *A single amino acid substitution (N297A) in the conserved NPXXY sequence of the human N-formyl peptide receptor results in inhibition of desensitization and endocytosis, and a dose-dependent shift in p42/44 mitogen-activated protein kinase activation and chemotaxis*. Biochem J, 2000. **352 Pt 2**: p. 399-407.
9. Tan, K., et al., *Functional characterization and structural modeling of obesity associated mutations in the melanocortin 4 receptor*. Endocrinology, 2009. **150**(1): p. 114-25.
10. Shinyama, H., et al., *Regulation of melanocortin-4 receptor signaling: agonist-mediated desensitization and internalization*. Endocrinology, 2003. **144**(4): p. 1301-14.
11. Adan, R.A. and W.H. Gispen, *Brain melanocortin receptors: from cloning to function*. Peptides, 1997. **18**(8): p. 1279-87.
12. Chhajlani, V. and J.E. Wikberg, *Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA*. FEBS Lett, 1992. **309**(3): p. 417-20.
13. Pogozeva, I.D., et al., *Interactions of human melanocortin 4 receptor with nonpeptide and peptide agonists*. Biochemistry, 2005. **44**(34): p. 11329-41.
14. Elsner, A., et al., *MC4R oligomerizes independently of extracellular cysteine residues*. Peptides, 2006. **27**(2): p. 372-9.
15. Ellgaard, L. and A. Helenius, *ER quality control: towards an understanding at the molecular level*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(4): p. 431-7.
16. Ruiz-Canada, C., D.J. Kelleher, and R. Gilmore, *Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of polypeptides by distinct mammalian OST isoforms*. Cell, 2009. **136**(2): p. 272-83.
17. Silberstein, S. and R. Gilmore, *Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase*. FASEB J, 1996. **10**(8): p. 849-58.
18. Welply, J.K., et al., *Substrate recognition by oligosaccharyltransferase. Studies on glycosylation of modified Asn-X-Thr/Ser tripeptides*. J Biol Chem, 1983. **258**(19): p. 11856-63.
19. Knauer, R. and L. Lehle, *The oligosaccharyltransferase complex from yeast*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1426**(2): p. 259-73.

20. Thanka Christlet, T.H. and K. Veluraja, *Database analysis of O-glycosylation sites in proteins*. Biophys J, 2001. **80**(2): p. 952-60.
21. Kornfeld, R. and S. Kornfeld, *Assembly of asparagine-linked oligosaccharides*. Annu Rev Biochem, 1985. **54**: p. 631-64.
22. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P., *Molecular biology of the cell*. 4th edition ed. 2001, New york: Garland Science.
23. Ho, G. and R.G. MacKenzie, *Functional characterization of mutations in melanocortin-4 receptor associated with human obesity*. J Biol Chem, 1999. **274**(50): p. 35816-22.
24. **Jeremy M. Berg, J.L.T., Lubert Stryer & Neil D. Clarke**, *Biochemistry*. 5th ed, ed. W.H.F.a. Company. 2002, New York: Michelle Julet.
25. Adan, R.A., et al., *The MC4 receptor and control of appetite*. Br J Pharmacol, 2006. **149**(7): p. 815-27.
26. Mountjoy, K.G., et al., *The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors*. Science, 1992. **257**(5074): p. 1248-51.
27. Desarnaud, F., et al., *Molecular cloning, functional expression and pharmacological characterization of a mouse melanocortin receptor gene*. Biochem J, 1994. **299** (Pt 2): p. 367-73.
28. Gantz, I., et al., *Molecular cloning of a novel melanocortin receptor*. J Biol Chem, 1993. **268**(11): p. 8246-50.
29. Roselli-Rehfuss, L., et al., *Identification of a receptor for gamma melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(19): p. 8856-60.
30. Mountjoy, K.G., et al., *Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain*. Mol Endocrinol, 1994. **8**(10): p. 1298-308.
31. Barrett, P., et al., *Cloning and expression of a new member of the melanocyte-stimulating hormone receptor family*. J Mol Endocrinol, 1994. **12**(2): p. 203-13.
32. Chhajlani, V., R. Muceniece, and J.E. Wikberg, *Molecular cloning of a novel human melanocortin receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **195**(2): p. 866-73.
33. Gantz, I., et al., *Molecular cloning, expression, and characterization of a fifth melanocortin receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **200**(3): p. 1214-20.
34. Griffon, N., et al., *Molecular cloning and characterization of the rat fifth melanocortin receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **200**(2): p. 1007-14.
35. Labbe, O., et al., *Molecular cloning of a mouse melanocortin 5 receptor gene widely expressed in peripheral tissues*. Biochemistry, 1994. **33**(15): p. 4543-9.
36. Wilczynski, A., et al., *Identification of putative agouti-related protein(87-132)-melanocortin-4 receptor interactions by homology molecular modeling and validation using chimeric peptide ligands*. J Med Chem, 2004. **47**(9): p. 2194-207.
37. Lu, D., et al., *Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor*. Nature, 1994. **371**(6500): p. 799-802.
38. Stutz, A.M., C.D. Morrison, and G. Argyropoulos, *The agouti-related protein and its role in energy homeostasis*. Peptides, 2005. **26**(10): p. 1771-81.
39. Haskell-Luevano, C. and E.K. Monck, *Agouti-related protein functions as an inverse agonist at a constitutively active brain melanocortin-4 receptor*. Regul Pept, 2001. **99**(1): p. 1-7.
40. Nijenhuis, W.A., J. Oosterom, and R.A. Adan, *AgRP(83-132) acts as an inverse agonist on the human-melanocortin-4 receptor*. Mol Endocrinol, 2001. **15**(1): p. 164-71.
41. Tolle, V. and M.J. Low, *In vivo evidence for inverse agonism of Agouti-related peptide in the central nervous system of proopiomelanocortin-deficient mice*. Diabetes, 2008. **57**(1): p. 86-94.

42. Sanchez, E., et al., *Phosphodiesterase inhibitor-dependent inverse agonism of agouti-related protein on melanocortin 4 receptor in sea bass (Dicentrarchus labrax)*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2009. **296**(5): p. R1293-306.
43. Garfield, A.S., et al., *Role of central melanocortin pathways in energy homeostasis*. Trends Endocrinol Metab, 2009. **20**(5): p. 203-15.
44. Schwartz, M.W., et al., *Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus*. Diabetes, 1997. **46**(12): p. 2119-23.
45. Barsh, G.S. and M.W. Schwartz, *Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(8): p. 589-600.
46. Gardiner, J.V., C.N. Jayasena, and S.R. Bloom, *Gut hormones: a weight off your mind*. J Neuroendocrinol, 2008. **20**(6): p. 834-41.
47. Heisler, L.K., et al., *Serotonin reciprocally regulates melanocortin neurons to modulate food intake*. Neuron, 2006. **51**(2): p. 239-49.
48. Balthasar, N., et al., *Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure*. Cell, 2005. **123**(3): p. 493-505.
49. Kublaoui, B.M., et al., *Sim1 haploinsufficiency impairs melanocortin-mediated anorexia and activation of paraventricular nucleus neurons*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(10): p. 2483-92.
50. Baskin, D.G., *Single-minded view of melanocortin signaling in energy homeostasis*. Endocrinology, 2006. **147**(10): p. 4539-41.
51. Chai, B., et al., *Melanocortin-4 receptor activation inhibits c-Jun N-terminal kinase activity and promotes insulin signaling*. Peptides, 2009. **30**(6): p. 1098-104.
52. Shaw, A.M., et al., *Ghrelin-induced food intake and growth hormone secretion are altered in melanocortin 3 and 4 receptor knockout mice*. Peptides, 2005. **26**(10): p. 1720-7.
53. Cowley, M.A., et al., *Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus*. Nature, 2001. **411**(6836): p. 480-4.
54. Raposinho, P.D., R.B. White, and M.L. Aubert, *The melanocortin agonist Melanotan-II reduces the orexigenic and adipogenic effects of neuropeptide Y (NPY) but does not affect the NPY-driven suppressive effects on the gonadotropic and somatotrophic axes in the male rat*. J Neuroendocrinol, 2003. **15**(2): p. 173-81.
55. Frigeri, L.G., G.L. Wolff, and C. Teguh, *Differential responses of yellow Avy/A and agouti A/a (BALB/c X VY) F1 hybrid mice to the same diets: glucose tolerance, weight gain, and adipocyte cellularity*. Int J Obes, 1988. **12**(4): p. 305-20.
56. Koegler, F.H., et al., *Macronutrient diet intake of the lethal yellow agouti (Ay/a) mouse*. Physiol Behav, 1999. **67**(5): p. 809-12.
57. Fan, W., et al., *Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome*. Nature, 1997. **385**(6612): p. 165-8.
58. Wortley, K.E., et al., *Agouti-related protein-deficient mice display an age-related lean phenotype*. Cell Metab, 2005. **2**(6): p. 421-7.
59. Bewick, G.A., et al., *Post-embryonic ablation of AgRP neurons in mice leads to a lean, hypophagic phenotype*. FASEB J, 2005. **19**(12): p. 1680-2.
60. Gropp, E., et al., *Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding*. Nat Neurosci, 2005. **8**(10): p. 1289-91.
61. Luquet, S., et al., *NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates*. Science, 2005. **310**(5748): p. 683-5.
62. Xu, A.W. and G.S. Barsh, *MC4R neurons weigh in differently*. Nat Neurosci, 2006. **9**(1): p. 15-6.
63. Conn, P.M., et al., *G protein-coupled receptor trafficking in health and disease: lessons learned to prepare for therapeutic mutant rescue in vivo*. Pharmacol Rev, 2007. **59**(3): p. 225-50.
64. Hurtley, S.M. and A. Helenius, *Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum*. Annu Rev Cell Biol, 1989. **5**: p. 277-307.

65. Ellgaard, L., M. Molinari, and A. Helenius, *Setting the standards: quality control in the secretory pathway*. Science, 1999. **286**(5446): p. 1882-8.
66. Wild, K., K.R. Rosendal, and I. Sinning, *A structural step into the SRP cycle*. Mol Microbiol, 2004. **53**(2): p. 357-63.
67. Nita-Lazar, M., et al., *The N-X-S/T consensus sequence is required but not sufficient for bacterial N-linked protein glycosylation*. Glycobiology, 2005. **15**(4): p. 361-7.
68. Wang, T. and D.N. Hebert, *EDEM an ER quality control receptor*. Nat Struct Biol, 2003. **10**(5): p. 319-21.
69. Castro-Fernandez, C., G. Maya-Nunez, and P.M. Conn, *Beyond the signal sequence: protein routing in health and disease*. Endocr Rev, 2005. **26**(4): p. 479-503.
70. Mizrahi, D. and D.L. Segaloff, *Intracellularly located misfolded glycoprotein hormone receptors associate with different chaperone proteins than their cognate wild-type receptors*. Mol Endocrinol, 2004. **18**(7): p. 1768-77.
71. Molinari, M., *N-glycan structure dictates extension of protein folding or onset of disposal*. Nat Chem Biol, 2007. **3**(6): p. 313-20.
72. Appenzeller, C., et al., *The lectin ERGIC-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(6): p. 330-4.
73. Schrag, J.D., et al., *Lectin control of protein folding and sorting in the secretory pathway*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(1): p. 49-57.
74. Hauri, H., et al., *Lectins and traffic in the secretory pathway*. FEBS Lett, 2000. **476**(1-2): p. 32-7.
75. Kamiya, Y., et al., *Molecular basis of sugar recognition by the human L-type lectins ERGIC-53, VIPL, and VIP36*. J Biol Chem, 2008. **283**(4): p. 1857-61.
76. Heroux, M., et al., *Assembly and signaling of CRLR and RAMP1 complexes assessed by BRET*. Biochemistry, 2007. **46**(23): p. 7022-33.
77. Chan, L.F., et al., *MRAP and MRAP2 are bidirectional regulators of the melanocortin receptor family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(15): p. 6146-51.
78. Decailot, F.M., et al., *Cell surface targeting of mu-delta opioid receptor heterodimers by RTP4*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(41): p. 16045-50.
79. Cooray, S.N., et al., *Accessory proteins are vital for the functional expression of certain G protein-coupled receptors*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **300**(1-2): p. 17-24.
80. Bermak, J.C., et al., *Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(5): p. 492-8.
81. Bermak, J.C. and Q.Y. Zhou, *Accessory proteins in the biogenesis of G protein-coupled receptors*. Mol Interv, 2001. **1**(5): p. 282-7.
82. Leclerc, P.C., et al., *A polyaromatic caveolin-binding-like motif in the cytoplasmic tail of the type 1 receptor for angiotensin II plays an important role in receptor trafficking and signaling*. Endocrinology, 2002. **143**(12): p. 4702-10.
83. Dupre, D.J., et al., *Dopamine receptor-interacting protein 78 acts as a molecular chaperone for Ggamma subunits before assembly with Gbeta*. J Biol Chem, 2007. **282**(18): p. 13703-15.
84. Nakatsukasa, K. and J.L. Brodsky, *The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum*. Traffic, 2008. **9**(6): p. 861-70.
85. Hosokawa, N., et al., *EDEM accelerates ERAD by preventing aberrant dimer formation of misfolded alpha1-antitrypsin*. Genes Cells, 2006. **11**(5): p. 465-76.
86. Olivari, S., et al., *EDEM1 regulates ER-associated degradation by accelerating demannosylation of folding-defective polypeptides and by inhibiting their covalent aggregation*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **349**(4): p. 1278-84.
87. Bernier, V., D.G. Bichet, and M. Bouvier, *Pharmacological chaperone action on G-protein-coupled receptors*. Curr Opin Pharmacol, 2004. **4**(5): p. 528-33.

88. Clark, A.J., et al., *Inherited ACTH insensitivity illuminates the mechanisms of ACTH action*. Trends Endocrinol Metab, 2005. **16**(10): p. 451-7.
89. Morello, J.P., et al., *Pharmacological chaperones: a new twist on receptor folding*. Trends Pharmacol Sci, 2000. **21**(12): p. 466-9.
90. Denning, G.M., et al., *Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive*. Nature, 1992. **358**(6389): p. 761-4.
91. Leandro, P. and C.M. Gomes, *Protein misfolding in conformational disorders: rescue of folding defects and chemical chaperoning*. Mini Rev Med Chem, 2008. **8**(9): p. 901-11.
92. Tamarappoo, B.K. and A.S. Verkman, *Defective aquaporin-2 trafficking in nephrogenic diabetes insipidus and correction by chemical chaperones*. J Clin Invest, 1998. **101**(10): p. 2257-67.
93. Yoshida, H., et al., *Chemical chaperones reduce aggregate formation and cell death caused by the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch*. Neurobiol Dis, 2002. **10**(2): p. 88-99.
94. Uversky, V.N., J. Li, and A.L. Fink, *Trimethylamine-N-oxide-induced folding of alpha-synuclein*. FEBS Lett, 2001. **509**(1): p. 31-5.
95. Yang, D.S., et al., *Manipulating the amyloid-beta aggregation pathway with chemical chaperones*. J Biol Chem, 1999. **274**(46): p. 32970-4.
96. Singh, L.R., et al., *Chemical chaperone rescue of mutant human cystathionine beta-synthase*. Mol Genet Metab, 2007. **91**(4): p. 335-42.
97. Leandro, P., et al., *Glycerol increases the yield and activity of human phenylalanine hydroxylase mutant enzymes produced in a prokaryotic expression system*. Mol Genet Metab, 2001. **73**(2): p. 173-8.
98. Song, J.L. and D.T. Chuang, *Natural osmolyte trimethylamine N-oxide corrects assembly defects of mutant branched-chain alpha-ketoacid decarboxylase in maple syrup urine disease*. J Biol Chem, 2001. **276**(43): p. 40241-6.
99. Brown, C.R., L.Q. Hong-Brown, and W.J. Welch, *Correcting temperature-sensitive protein folding defects*. J Clin Invest, 1997. **99**(6): p. 1432-44.
100. Loo, T.W. and D.M. Clarke, *Correction of defective protein kinesis of human P-glycoprotein mutants by substrates and modulators*. J Biol Chem, 1997. **272**(2): p. 709-12.
101. Bernier, V., et al., *Pharmacological chaperones: potential treatment for conformational diseases*. Trends Endocrinol Metab, 2004. **15**(5): p. 222-8.
102. Morello, J.P., et al., *Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants*. J Clin Invest, 2000. **105**(7): p. 887-95.
103. Bernier, V., et al., *Functional rescue of the constitutively internalized V2 vasopressin receptor mutant R137H by the pharmacological chaperone action of SR49059*. Mol Endocrinol, 2004. **18**(8): p. 2074-84.
104. Ellgaard, L. and A. Helenius, *Quality control in the endoplasmic reticulum*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(3): p. 181-91.
105. Morello, J.P., et al., *Association of calnexin with wild type and mutant AVPR2 that causes nephrogenic diabetes insipidus*. Biochemistry, 2001. **40**(23): p. 6766-75.
106. Bernier, V., et al., *Pharmacologic chaperones as a potential treatment for X-linked nephrogenic diabetes insipidus*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(1): p. 232-43.
107. Petaja-Repo, U.E., et al., *Ligands act as pharmacological chaperones and increase the efficiency of delta opioid receptor maturation*. EMBO J, 2002. **21**(7): p. 1628-37.
108. Janovick, J.A., et al., *Structure-activity relations of successful pharmacologic chaperones for rescue of naturally occurring and manufactured mutants of the gonadotropin-releasing hormone receptor*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. **305**(2): p. 608-14.

109. Janovick, J.A., G. Maya-Nunez, and P.M. Conn, *Rescue of hypogonadotropic hypogonadism-causing and manufactured GnRH receptor mutants by a specific protein-folding template: misrouted proteins as a novel disease etiology and therapeutic target*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(7): p. 3255-62.
110. Noorwez, S.M., et al., *Pharmacological chaperone-mediated in vivo folding and stabilization of the P23H-opsin mutant associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 14442-50.
111. Huang, Y. and G.E. Breitwieser, *Rescue of calcium-sensing receptor mutants by allosteric modulators reveals a conformational checkpoint in receptor biogenesis*. J Biol Chem, 2007. **282**(13): p. 9517-25.
112. Arasasingham, P.N., et al., *Structure-activity relationship of (1-aryl-2-piperazinylethyl)piperazines: antagonists for the AGRP/melanocortin receptor binding*. J Med Chem, 2003. **46**(1): p. 9-11.
113. Sebhat, I.K., et al., *Design and pharmacology of N-[(3R)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolinium- 3-ylcarbonyl]-(1R)-1-(4-chlorobenzyl)- 2-[4-cyclohexyl-4-(1H-1,2,4-triazol- 1-ylmethyl)piperidin-1-yl]-2-oxoethylamine (1), a potent, selective, melanocortin subtype-4 receptor agonist*. J Med Chem, 2002. **45**(21): p. 4589-93.
114. Pontillo, J., et al., *A potent and selective nonpeptide antagonist of the melanocortin-4 receptor induces food intake in satiated mice*. Bioorg Med Chem Lett, 2005. **15**(10): p. 2541-6.
115. Pontillo, J., et al., *Optimization of piperazinebenzylamines with a N-(1-methoxy-2-propyl) side chain as potent and selective antagonists of the human melanocortin-4 receptor*. Bioorg Med Chem Lett, 2005. **15**(20): p. 4615-8.
116. Hamdan, F.F., et al., *High-throughput screening of G protein-coupled receptor antagonists using a bioluminescence resonance energy transfer 1-based beta-arrestin2 recruitment assay*. J Biomol Screen, 2005. **10**(5): p. 463-75.
117. Marquardt, D.W., J. Soc. Indust. Appl. Math. , 1963. **11**: p. 431-441.
118. Press, W.H., Teukolsky, S. A., Vetterling, W. T., and Flannery, B. P. , *Numerical recipes in C: the art of scientific computing*. 2002, NY: Cambridge University Press.
119. Efron, B., Tibshirani, R. J. , *An introduction to the bootstrap*. 1994, Chapman & Hall/CRC: NY.
120. Yang, Y., et al., *Key amino acid residues in the melanocortin-4 receptor for nonpeptide THIQ specific binding and signaling*. Regul Pept, 2009. **155**(1-3): p. 46-54.
121. Angers, S., et al., *Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3684-9.
122. Mercier, J.F., et al., *Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer*. J Biol Chem, 2002. **277**(47): p. 44925-31.
123. Gao, Z., et al., *Agonist-dependent internalization of the human melanocortin-4 receptors in human embryonic kidney 293 cells*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. **307**(3): p. 870-7.
124. Chen, I., et al., *Site-specific labeling of cell surface proteins with biophysical probes using biotin ligase*. Nat Methods, 2005. **2**(2): p. 99-104.
125. Breit, A., et al., *The natural inverse agonist agouti-related protein induces arrestin-mediated endocytosis of melanocortin-3 and -4 receptors*. J Biol Chem, 2006. **281**(49): p. 37447-56.
126. Hamdan, F.F., et al., *Unraveling G protein-coupled receptor endocytosis pathways using real-time monitoring of agonist-promoted interaction between beta-arrestins and AP-2*. J Biol Chem, 2007. **282**(40): p. 29089-100.
127. Kohout, T.A. and R.J. Lefkowitz, *Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization*. Mol Pharmacol, 2003. **63**(1): p. 9-18.

128. Ferguson, S.S., *Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling*. Pharmacol Rev, 2001. **53**(1): p. 1-24.
129. Dupre, D.J., et al., *Seven transmembrane receptor core signaling complexes are assembled prior to plasma membrane trafficking*. J Biol Chem, 2006. **281**(45): p. 34561-73.
130. Abe, Y., et al., *Functional analysis of five endothelin-B receptor mutations found in human Hirschsprung disease patients*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **275**(2): p. 524-31.
131. Meysing, A.U., et al., *GNRHR mutations in a woman with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism highlight the differential sensitivity of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone to gonadotropin-releasing hormone*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(7): p. 3189-98.
132. Tao, Y.X., *Inactivating mutations of G protein-coupled receptors and diseases: structure-function insights and therapeutic implications*. Pharmacol Ther, 2006. **111**(3): p. 949-73.
133. Sebag, J.A. and P.M. Hinkle, *Opposite effects of the melanocortin-2 receptor accessory protein MRAP on MC2 and MC5 receptor dimerization and trafficking*. J Biol Chem, 2009.
134. Hinkle, P.M. and J.A. Sebag, *Structure and function of the melanocortin2 receptor accessory protein (MRAP)*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **300**(1-2): p. 25-31.
135. Haqq, A.M., et al., *Characterization of a novel binding partner of the melanocortin-4 receptor: attractin-like protein*. Biochem J, 2003. **376**(Pt 3): p. 595-605.
136. Chung, T.T., et al., *The majority of adrenocorticotropin receptor (melanocortin 2 receptor) mutations found in familial glucocorticoid deficiency type 1 lead to defective trafficking of the receptor to the cell surface*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(12): p. 4948-54.
137. Petaja-Repo, U.E., et al., *Newly synthesized human delta opioid receptors retained in the endoplasmic reticulum are retrotranslocated to the cytosol, deglycosylated, ubiquitinated, and degraded by the proteasome*. J Biol Chem, 2001. **276**(6): p. 4416-23.
138. Hermosilla, R., et al., *Disease-causing V(2) vasopressin receptors are retained in different compartments of the early secretory pathway*. Traffic, 2004. **5**(12): p. 993-1005.
139. Nakamura, N., et al., *Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130*. J Cell Biol, 1995. **131**(6 Pt 2): p. 1715-26.
140. Roquemore, E.P. and G. Banting, *Efficient trafficking of TGN38 from the endosome to the trans-Golgi network requires a free hydroxyl group at position 331 in the cytosolic domain*. Mol Biol Cell, 1998. **9**(8): p. 2125-44.
141. Girotti, M. and G. Banting, *TGN38-green fluorescent protein hybrid proteins expressed in stably transfected eukaryotic cells provide a tool for the real-time, in vivo study of membrane traffic pathways and suggest a possible role for ratTGN38*. J Cell Sci, 1996. **109** (Pt 12): p. 2915-26.
142. Antony, C., et al., *The small GTP-binding protein rab6p is distributed from medial Golgi to the trans-Golgi network as determined by a confocal microscopic approach*. J Cell Sci, 1992. **103** (Pt 3): p. 785-96.
143. Zhao, Y.Y., et al., *Functional roles of N-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer*. Cancer Sci, 2008. **99**(7): p. 1304-10.
144. Galandrin, S., et al., *Conformational rearrangements and signaling cascades involved in ligand-biased mitogen-activated protein kinase signaling through the beta1-adrenergic receptor*. Mol Pharmacol, 2008. **74**(1): p. 162-72.
145. Kenakin, T., *Collateral efficacy in drug discovery: taking advantage of the good (allosteric) nature of 7TM receptors*. Trends Pharmacol Sci, 2007. **28**(8): p. 407-15.

146. Bouvier, M., et al., *Two distinct pathways for cAMP-mediated down-regulation of the beta 2-adrenergic receptor. Phosphorylation of the receptor and regulation of its mRNA level.* J Biol Chem, 1989. **264**(28): p. 16786-92.
147. Nantel, F., et al., *Cell-specific down-regulation of the beta 3-adrenergic receptor.* J Biol Chem, 1994. **269**(18): p. 13148-55.
148. Clark, A.J., et al., *Expression, desensitization, and internalization of the ACTH receptor (MC2R).* Ann N Y Acad Sci, 2003. **994**: p. 111-7.
149. Petaja-Repo, U.E., et al., *Export from the endoplasmic reticulum represents the limiting step in the maturation and cell surface expression of the human delta opioid receptor.* J Biol Chem, 2000. **275**(18): p. 13727-36.
150. Khong, K., et al., *Expression of functional melanocortin-4 receptor in the hypothalamic GT1-1 cell line.* Neuroendocrinology, 2001. **74**(3): p. 193-201.
151. Buech, T.R., et al., *Pertussis toxin sensitive signalling of melanocortin-4 receptors in hypothalamic GT1-7 cells defines AGRP as a biased agonist.* J Biol Chem, 2009.

7. ANNEXES

7.1 Spécificité des CP au MC4R

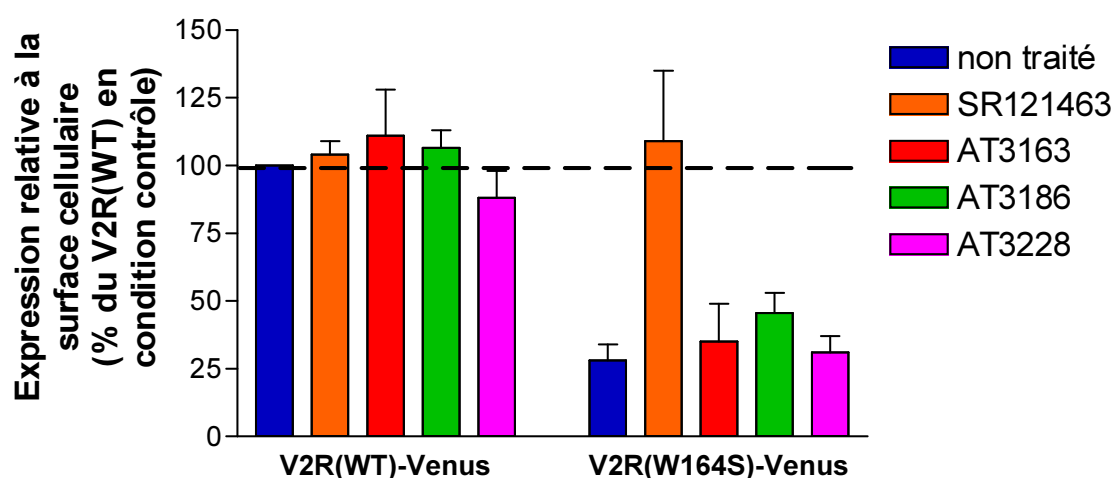


Figure 7.1. Effet des chaperones pharmacologiques spécifiques au MC4R sur le réchappement de l'expression à la surface cellulaire du V2R. Des cellules HEK293T exprimant de manière transitoire les protéines de fusion 3HA-V2R(WT)-Venus ou 3HA-V2R(W164S)-Venus ont été incubées en absence ou présence de 10 μ M de composé spécifique au MC4R (**AT3163**, **AT3186** et **AT3228**) ou spécifique au V2R (**SR121463**) pendant 16 h. Les récepteurs à la surface cellulaire ont été marqués en combinant un anticorps anti-HA de souris et un anticorps anti-souris conjugué au fluorophore Alexa647. L'expression relative à la surface cellulaire est calculée en faisant le ratio Alexa647/Venus (surface/total) pour l'ensemble des cellules exprimant le récepteur. Les valeurs ont été calculées en pourcentage en prenant comme référence le WT non traité. La ligne pointillée représente en l'expression relative à la surface cellulaire en situation **non traité** du V2R(WT), qui est arbitrairement établi à 100%. Non traité: DMEM 0,1%DMSO. Ces résultats représentent la moyenne \pm SEM de 2 ou 3 expériences indépendantes. Ces résultats ont été générés par Patricia René.

7.2 Rétablissement de l'expression à la surface cellulaire du V2R par le composé **SR121463**

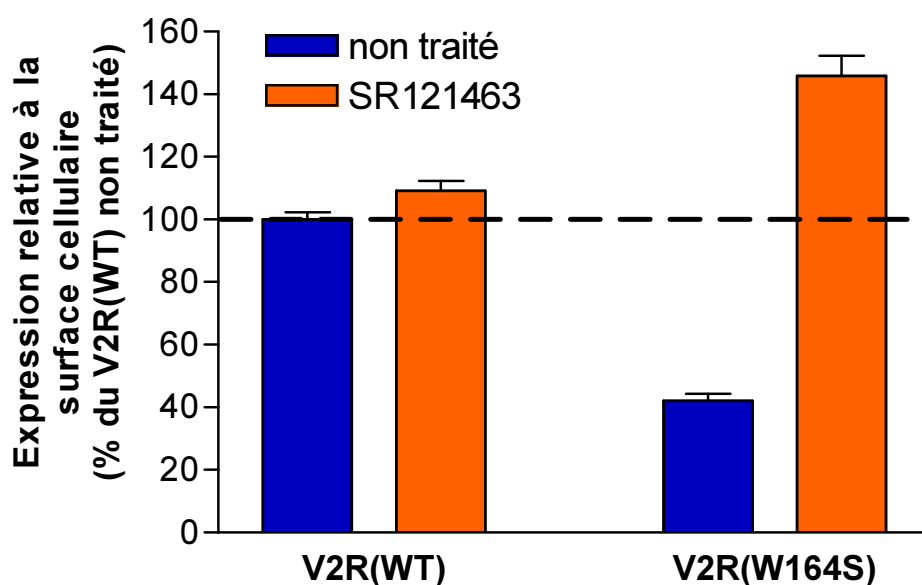


Figure 7.2. Expression relative à la surface cellulaire du V2R mesurée par cytométrie de flux. Des cellules HEK293T exprimant de manière transitoire les protéines de fusion 3HA-V2R(WT)-Luc ou 3HA-V2R(W164S)-Luc ont été incubées en absence ou présence de 10 μ M de CP spécifique au MC4R pendant 16 h. Les récepteurs à la surface cellulaire ont été marqués en combinant un anticorps anti-HA de souris et un anticorps anti-souris conjugué au fluorophore Alexa647. L'expression relative à la surface cellulaire est calculée en divisant la valeur de la fluorescence Alexa647 par la valeur de luminescence relative (surface/total). Les valeurs ont été calculées en pourcentage en prenant comme référence le WT **non traité**. La ligne pointillée représente l'expression relative à la surface cellulaire en situation non traité du 3HA-V2R(WT)-Luc, qui est arbitrairement établi à 100% et considéré comme le niveau de réchappement total. Non traité: DMEM sans DMSO. (n=2)

7.3 Marquages métaboliques au ^{35}S du MC4R et du V2R suivi de chasses

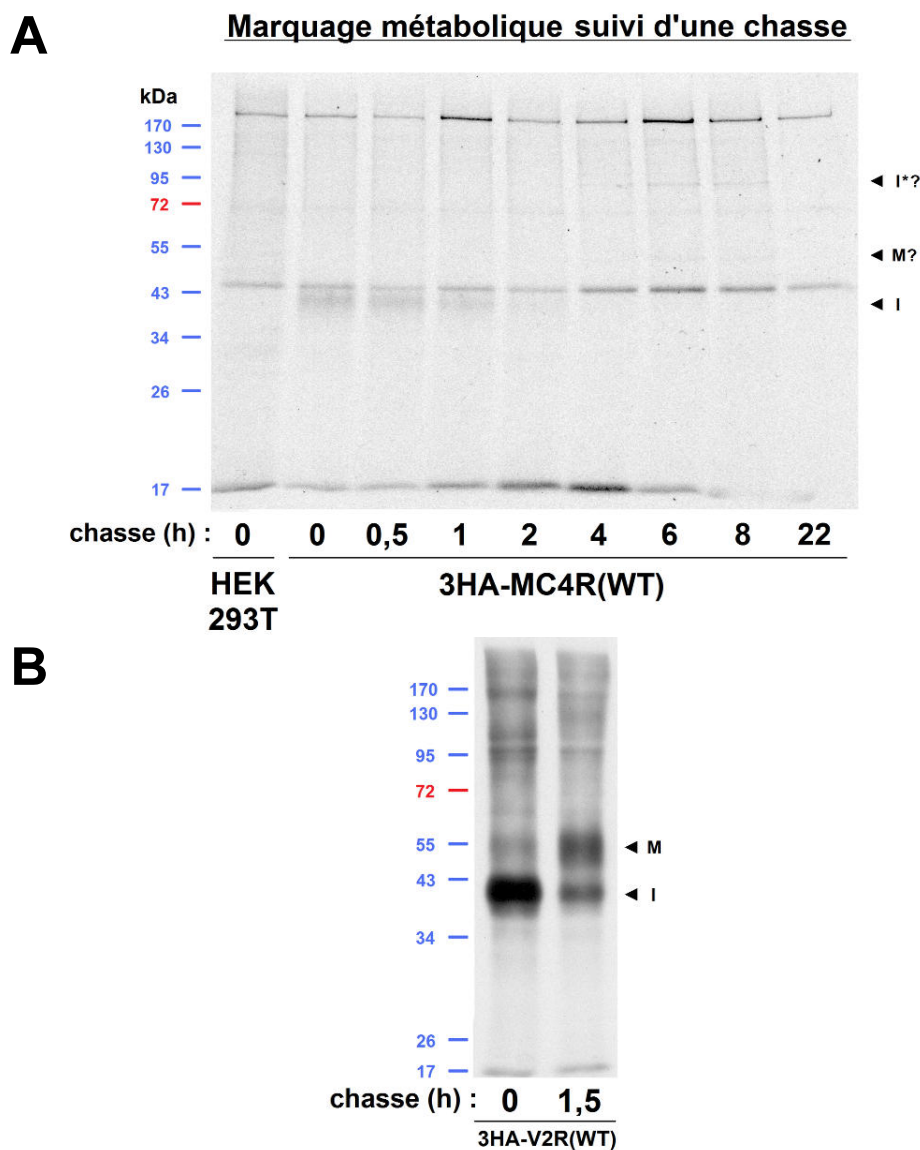


Figure 7.3. Marquage métabolique du 3HA-MC4R(WT) et du 3HA-V2R(WT) suivi d'une chasse. Des cellules exprimant de manière stable la protéine de fusion 3HA-MC4R(WT) (**A**) ou 3HA-V2R(WT) (**B**) ont été incubées dans du milieu sans FBS (jeûne) 60 min (A) ou 30 min (B) pour ensuite être incubées dans du milieu contenant de la méthionine et de la cystéine radiomarquée au ^{35}S (marquage) 90 min (A) ou 30 min (B). Une fois l'étape de marquage terminée, les cellules sont lavées et incubées dans du milieu avec de la met/cys froide pendant différentes périodes de temps. Les cellules sont ensuite récoltées et lysées. Les différentes protéines de fusion ont été ensuite immunoprécipitées en présence de l'anticorps anti-HA (HA.11 de Covance) et des billes protéine G-sépharose. Une 2^e IP a été effectuée subséquemment sur l'éluat de la 1^{ère} IP sur une deuxième série de billes d'agarose pré-couplées à un anticorps anti-HA (clone 3F10). L'éluat a été fractionné par immunobuvardage de type Western. Les récepteurs ont été révélés par autoradiographie. (temps d'exposition : ~4 semaines). Les formes immature (I) et mature (M) sont identifiées. (A) n=1, (B) n=1.

7.3.1 Principe et explication des résultats

L'essai de marquage métabolique permet normalement de suivre la maturation de néo-récepteurs dans le temps sur SDS-PAGE par l'incorporation de méthionine et cystéine radiomarquées au ^{35}S . Suite à des chasses (arrêt de l'incubation des cellules dans le milieu de marquage et ajout d'un surplus de méthionine et cystéine froides) de différentes périodes de temps, la maturation (par le niveau de glycosylation) du néo-récepteur radiomarké dans le temps peut être suivie sur gel d'acrylamide par la variation de la masse moléculaire du récepteur. Le détail de la procédure est présent dans la section Matériel et méthodes.

Afin de montrer que la faiblesse du signal n'est pas attribuée à un problème technique, le marquage métabolique a été fait sur le récepteur V2R, et s'est avéré concluant (figure 7.3B). Nous avons utilisé des clones stables exprimant peu de récepteur afin de minimiser l'engorgement du RE. Il serait possible de travailler avec des clones exprimant plus fortement le récepteur, afin d'augmenter la proportion de récepteur vu sur gel. Une autre possibilité serait d'augmenter la quantité de cellules avec quoi travailler, mais nous étions déjà en format de pétri de 150 mm. Travailler avec plus de cellules implique une plus grande quantité de pétris et de radioactivité, ce qui n'est pas nécessairement logistiquement exécutable.

Des tests ont été faits afin de trouver le meilleur temps de marquage. Pour le V2R, 30 min sont suffisantes. Mais pour le MC4R, que l'on suspecte comme ayant une cinétique de maturation plus lente, un marquage plus long s'est imposé. Un marquage de 90 min s'est vu optimal. Il faut rappeler que le temps de marquage ne doit pas être trop long car sinon le bruit de fond par les autres protéines néo-synthétisées, aussi radiomarquées, augmente proportionnellement. Afin de réduire le bruit de fond, deux IP consécutives avec deux anticorps anti-HA de différents clones ont été exécutées. De cette manière, le bruit de fond associé au 1^{er} anticorps peut être éliminé suite à l'IP de l'échantillon purifié par le 2^e anticorps.

Une faible bande correspondant au récepteur immature se dissipe peu à peu dans les 4 premiers puits du 3HA-MC4R(WT). Avec cette information, il a été possible d'estimer la demi-vie de l'immature à l'aide d'un logiciel de densitométrie (QuantityOne), qui est évaluée à 1,18 h (intervalle de confiance : 1,69 – 0,91).

Toutefois, conjointement à la disparition de l'immature, une apparition de la forme mature se produit normalement. Une fine bande à ~55 kDa ainsi qu'une bande à ~95 kDa apparaissent plutôt un peu après la disparition de l'immature entre 4 et 6 h de chasse. Les formes matures avaient été identifiées comme étant à 70-74 kDa à la digestion avec les endoglycosidases sur l'IP de surface, mais l'IP de surface elle-même a montré une traînée allant de 55 à 95 kDa dont l'intensité était amplifiée suite aux traitements avec les CP. La bande à 95 kDa correspond possiblement à un dimère d'immature, et celle à 55 kDa, au récepteur ayant entamé sa maturation.

À première vue, la vitesse de maturation du MC4R semble être plutôt lente (l'apparition de la bande suspectée comme étant mature arrive après 4 h de chasse). Si tel est vraiment le cas, le MC4R se rapprocherait plutôt des récepteurs MC2R [148] et δ OR [149], qui ont aussi un problème de maturation dans les cellules HEK293T.

Le traitement avec les CP pourraient potentiellement avoir une action sur la vitesse de maturation du récepteur pour augmenter l'expression à la surface cellulaire. Il est aussi possible que la cinétique de maturation ne soit pas affectée mais que les récepteurs voués à la dégradation soient réchappés et que se soit leur réintégration dans la voie de sécrétion qui fasse varier l'expression à la surface cellulaire. En inhibant le protéasome 26S, la dégradation du MC4R pourrait être arrêtée. Si les CP réchappent les récepteurs voués à la dégradation, le traitement aurait alors la possibilité de réchapper plus de récepteur à la surface. Aussi, si le MC4R est ubiquitiné (ce qui pourrait être montré par une révélation avec un anticorps anti-ubiquitine sur l'immunobuvardage d'une IP du récepteur), le suivi du niveau d'ubiquitination du MC4R avec et sans traitement pourrait appuyer cette hypothèse.

7.4 Niveau d'expression des récepteurs-Luc dans les essais BRET de sortie du RE

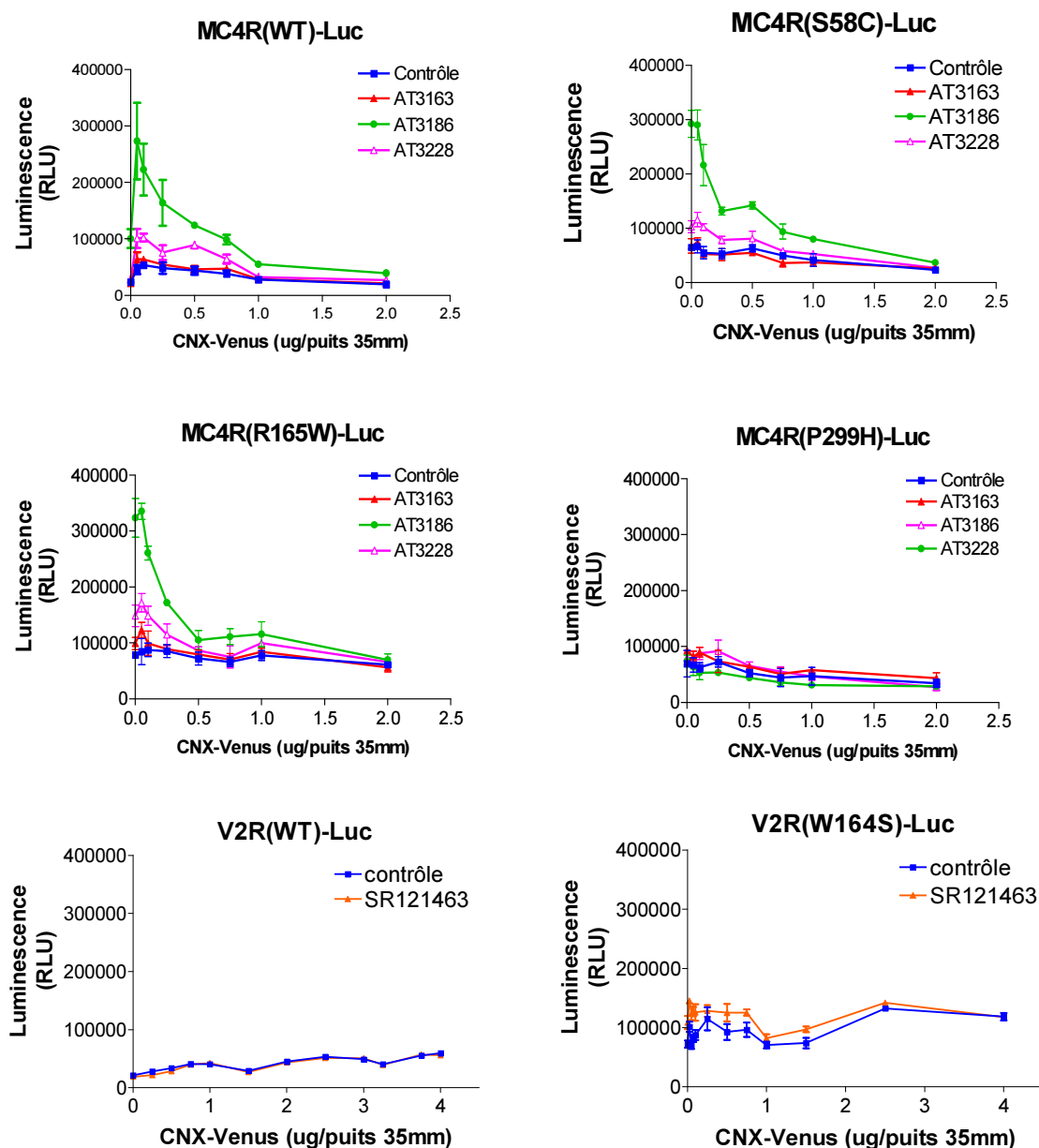


Figure 7.4. Niveau d'expression des récepteurs-Luc dans les essais BRET de sortie du RE. Des cellules HEK293T ont été co-transfectées de manière transitoire avec soit le 3HA-MC4R(WT)-Luc, 3HA-MC4R(S58C)-Luc, 3HA-MC4R(R165W)-Luc ou 3HA-MC4R(P299H)-Luc (A), soit le V2R(WT)-Rluc ou V2R(W164S)-Rluc (B), conjointement à une quantité croissante de CNX-Venus. Les cellules ont été transférées dans des plaques 96 puits 24 h après la transfection et ont été incubées en absence ou présence de 10 μ M **AT3163**, **AT3186** ou **AT3228** pour le MC4R, et 10 μ M **SR121463** pour le V2R, pour 16 h. Le transfert d'énergie a été initié par l'addition de 5 μ M de coelenterazine H à chaque puits et la luminescence a été mesurée dans le Multilabel Reader Mithras LB. Les données présentées sont représentatives de 2 ou 3 expériences indépendantes.